

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

КАФЕДРА ЦИТОЛОГИИ И ГИСТОЛОГИИ

Чубарь Анна Вадимовна

Выпускная квалификационная работа бакалавра

Маркерная характеристика стромальных клеток нормальной
и опухолевой ткани предстательной железы человека в
первичных культурах

Работа выполнена в лаборатории клеточной
патологии ФГУБН Института цитологии РАН

Научные руководители: д.б.н., в.н.с. Попов Б.В.

д.б.н., проф. Подгорная О. И.

Санкт-Петербург

2017

Содержание

Список сокращений.....	4
Введение	5
Глава 1. Обзор литературы	7
1.1. Развитие предстательной железы, анатомическая и гистологическая характеристика предстательной железы человека	7
1.2. Клеточный состав железистого и стромального компартмента ПЖ, маркеры эпителиальных и стромальных клеток ПЖ	10
1.3. Стволовые клетки ПЖ	12
1.4. Взаимодействие эпителиальных и стромальных клеток ПЖ в норме и при возникновении рака	15
1.5. Эпителиально-мезенхимный переход и его роль в механизме злокачественной трансформации ПЖ	19
1.6. Роль сигнального пути Wnt/b-катенин в развитии рака предстательной	22
Глава 2. Материалы и методы	26
2.1. Клеточные линии и культивирование клеток	26
2.2. Получение первичных культур	26
2.3. Пассирование клеток	27
2.4. Консервация и деконсервация клеток	27
2.5. Иммунофлуоресцентное окрашивание	28
2.6. Иммуногистохимическое окрашивание	29
Глава 3. Результаты	31
3.1. Маркерный профиль контрольных клеточных линий мезенхимного происхождения	31
3.2. Маркерный профиль контрольных клеточных линий эпителиального происхождения	32
3.3. Продукция мезенхимных маркеров на 2-ом и 7-ом пассажах в стромальных клетках ПЖ	33
3.4. Продукция эпителиальных маркеров на 2-ом и 7-ом пассажах в стромальных клетках ПЖ	36
3.5. Продукция регуляторных маркеров на 2-ом и 7-ом пассажах в стромальных клетках ПЖ	38
3.3. Маркерный профиль стромального компартмента нормальной и	

опухолевой ткани ПЖ по данным иммуногистохимии	41
Глава 4. Обсуждение	44
Выводы	48
Список литературы	49

Список сокращений

АР – андрогеновый рецептор
БСА – бычий сывороточный альбумин
ВКМ – внеклеточный матрикс
ГМК – гладкомышечные клетки
ИЛ – интерлейкин
МПС – мочеполовой синус
МЭП – мезенхимно-эпителиальный переход
НТ – нормальная ткань
ОТ – опухолевая ткань
ПЖ – предстательная железа
ПКФ – кислая простатическая фосфатаза
ПСА – простато-специфический антиген
СК – стволовые клетки
СКЭ – стволовые клетки эндометрия
СРК – стволовые раковые клетки
ТФ – транскрипционный фактор
ФБС – фетальная бычья сыворотка
ЦК – цитокератин
ЭМП – эпителиально-мезенхимный переход

Введение

Рак предстательной железы (ПЖ) – заболевание, занимающее четвёртое место по частоте среди раковых заболеваний в популяции и второе место – среди мужского населения в мире (Siegel et al., 2016). Риск развития рака ПЖ коррелирует с возрастом и обычно детектируется у пациентов старше 60-70 лет. В настоящее время ключевыми методами диагностики рака ПЖ являются макроскопическое исследование и определение уровня секреции ПСА, однако они обладают рядом недостатков, среди которых возможность ложноположительных результатов и недостаточно высокий уровень точности, что не позволяет достоверно предсказывать дальнейшее течение болезни и возможность рецидива (Bickers & Aukim-Hastie, 2009). Исходя из данных предпосылок, многочисленные исследования направлены на поиск более надёжных маркеров рака ПЖ. Одним из возможных направлений данных исследований является поиск маркеров, характерных для стромальных клеток в очаге опухолеобразования, что связано с ключевой ролью эпителиально-мезенхимных взаимодействий в ПЖ.

ПЖ является трубчато-альвеолярной железой, образованной двумя компартментами – эпителиальным и стромальным. Эпителий представлен тремя популяциями клеток: люминальными, базальными и нейроэндокринными. Основными типами клеток в строме являются ГМК, фибробласты и миофибробласты. Взаимодействие двух компартментов необходимо как в ходе развития ПЖ в эмбриогенезе, так и во взрослом состоянии, и обеспечивает нормальное функционирование органа. Нарушение нормального взаимодействия клеток может приводить к развитию рака. В подавляющем большинстве случаев трансформации подвергаются эпителиальные, а не стромальные клетки. Раковые клетки оказывают влияние на окружающую их строму и могут даже индуцировать их трансформацию. Изменённые стромальные клетки отличаются от нормальных, способствуют пролиферации опухолевых клеток и помогают им избегать иммунного надзора (Niu et al., 2009). Однако, на сегодняшний день характер продукции различных маркеров и изменение их уровня синтеза в стромальных клетках при развитии рака ПЖ описаны недостаточно.

Цель настоящего исследования: охарактеризовать продукцию мезенхимных, эпителиальных и регуляторных маркеров в первичных культурах стромальных клеток, полученных из нормальной и опухолевой ткани ПЖ человека, на ранних и поздних пассажах.

В рамках данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Получить первичные культуры стромальных клеток из нормальной и опухолевой ткани ПЖ пациентов, подвергнутых радикальной простатэктомии по поводу рака предстательной железы.
2. Оценить на 2-7 пассажах продукцию стромальными клетками нормальной и опухолевой ткани ПЖ мезенхимных (N-кадгерин, виментин), эпителиальных (Е-кадгерин, ЦК8) и регуляторных маркеров (β -катенин, Slug).
3. Провести сравнительный анализ продукции маркеров стромальными клетками нормальной и опухолевой ткани ПЖ в ходе их культивирования.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Развитие предстательной железы, анатомическая и гистологическая характеристика предстательной железы человека

Предстательная железа (ПЖ) – экзокринная трубчато-альвеолярная железа, относящаяся к добавочным железам мужской репродуктивной системы. ПЖ окружает уретру в основании мочевого пузыря и выделяет секрет, смешивающийся с семенной жидкостью. ПЖ есть только у млекопитающих. У человека ПЖ не имеет ярко выраженной зональности, масса органа не превышает 20 грамм, а размер около 4 x 2,5 см (Marker et al., 2003). В отличие от других добавочных желёз мужской репродуктивной системы, развивающихся из имеющего мезодермальную природу Вольфова протока, ПЖ развивается из мочеполювого синуса (МПС), производного задней кишки, имеющего энтодермальное происхождение (Abate-Shen & Shen, 2000). В середине эмбрионального развития происходит разделение клоаки на переднюю часть – мочеполювой синус и заднюю – прямую кишку. Это разделение осуществляется с помощью уроректальной перегородки. Из переднего отдела первичного мочеполювого синуса формируется мочевой пузырь. ПЖ развивается из тазовой части мочеполювого синуса на 7 неделе эмбрионального развития. До 10-12 недели развития, когда начинается формирование ПЖ, разницы в строении МПС между мужчинами и женщинами не наблюдается (Marker et al., 2003).

ПЖ развивается в эмбриональный период и полностью сформировывается к моменту рождения. При рождении ПЖ состоит из прямых, неветвящихся протоков. Ветвление протоков начинается за счёт деления эпителиальных клеток на дистальном конце (Prins et al, 1992), когда эпителий МПС достигает мезенхимы, лежащей к периферии от сфинктера уретры. Рисунок ветвления специфичен для каждой зоны ПЖ. Морфогенез ПЖ завершается между 15 и 30 днём постнатального развития. Окончательное развитие ПЖ происходит между 25 и 40 днём, на фоне резкого повышения уровня андрогенов (Prins, 2008). Дифференцировка мезенхимных и эпителиальных клеток происходит параллельно с ветвлением протоков в проксимально-дистальном направлении. Дифференцировка эпителиальных клеток на два типа у крыс связана с выборочной экспрессией цитокератинов и изменением в экспрессии AP (Hayward et al., 1996).

Ключевую роль в развитии ПЖ играет взаимодействие между эпителием и мезенхимой в МПС. При разделении этих двух компонентов ПЖ не развивается. В свою

очередь мезенхима МПС может индуцировать дифференцировку эпителия ПЖ из эпителия других органов (Cunha et al., 1987; Hayward, 1998).

В развитии ПЖ из МПС важную роль играют андрогены, синтезируемые семенниками. В отсутствии андрогенов развитие идёт по женскому типу и ПЖ не формируется. У человека тестостерон начинает синтезироваться с 9 недели. Ответ на андрогены опосредован ядерным АР, распознающим тестостерон и дигидротестостерон. С АР может связываться как тестостерон, так и его производное – дигиротестостерон, имеющий десятикратно большую аффинность к АР (Marker et al., 2003). Если образование дигидротестостерона блокируется, например, из-за мутации в гене, кодирующем фермент 5 α -редуктазу, ПЖ развивается в редуцированном виде (Andersson et al., 1991). Первым в ответ на воздействие андрогенов начинает экспрессироваться гомеобоксный ген *NKX3.1* в районе эпителия МПС. На морфологическом уровне изменения проявляются в развитии зачатка эпителия ПЖ из эпителия МПС (Marker et al., 2003).

Андрогены также влияют на развитие протоков желёз и их ветвление, причем рецепторы экспрессируются на мезенхимных, а не эпителиальных клетках. Кроме того, для нормального развития ПЖ необходим определённый уровень эстрогенов. В опытах Jarred (Jarred et al., 2002) с инактивацией рецепторов к эстрогенам у мышей показано нормальное развитие ПЖ. Таким образом, для развития ПЖ необходим определённый гормональный уровень в целом.

ПЖ человека образована железистым и нежелезистым компонентом. Снаружи ПЖ покрыта соединительно-тканной капсулой с высоким содержанием гладкомышечных клеток (ГМК). Железистый компонент ПЖ образован желёзками, которые располагаются концентрическими слоями вокруг уретры. Желёзки, как и образуемые ими дольки, окружены слоем ГМК стромы, сокращающихся в момент выброса секрета (McNeal, 1988). Желёзки ПЖ, в зависимости от их локализации в определённой зоне, делят на главные, промежуточные и периуретральные (слизистые). Желёзки ПЖ имеют трубчато-альвеолярное строение и образованы концевыми отделами и выводными протоками. Протоки и концевые отделы желёз ПЖ представляют из себя эластические секреторные резервуары. Выводные протоки периуретральных желёзок открываются в уретру на разных уровнях, главных и промежуточных желёзок – в области семенного бугорка. Все железы, за исключением главных, находящихся вблизи уретры, образованы столбчатыми секреторными клетками, одинаково устроенными в протоках и концевых отделах. При иммуногистохимическом окрашивании на простато-специфический антиген (ПСА) и кислую простатическую фосфатазу (КПФ) простаты клетки протоков и концевых отделов

красятся одинаково, из чего можно сделать вывод о том, что между этими клетками нет функциональной разницы (McNeal, 1988). Концевые отделы желёз на срезе представляют собой округлую структуру с впячиваниями, образованными складками эпителия. Эти складки, возможно, нужны для растяжения резервуаров при выбросе секрета. Отличительный признак рака ПЖ – идеально круглая или овальная форма концевых отделов желёз ПЖ, отражающая потерю функции резервуара.

Анатомически в ПЖ человека выделяют три доли: центральную, периферическую и промежуточную. Аденома простаты, доброкачественная опухоль, возникает в основном в промежуточной зоне, периферическая зона наиболее уязвима при воспалении, там же возникает большинство карцином (McNeal, 1968). Центральная зона наименее чувствительна к воспалению и раку. Периферическая зона ПЖ занимает около 70% её объёма, центральная – примерно 25%. Проксимальная часть простатической уретры занимает 5-10% железистого компонента ПЖ и почти весь он представлен промежуточной зоной (McNeal, 1978). Центральная зона окружает семявыбрасывающие протоки, в дальнейшем сливающиеся в общий семявыносящий проток. Промежуточная зона окружает мочеиспускательный канал, проходящий через ПЖ. Периферическая зона окружает центральную зону и содержит главные железы ПЖ. Между периферической и промежуточной зоной есть определённое различие, касающееся экспрессии генов (Heul-Nieuwenhuijsen et al., 2006).

Центральная зона обладает характерным строением, отличающим её от других зон ПЖ. Строение эпителия желёзок центральной зоны аналогично семявыбрасывающим каналам и семенным пузырькам. Предполагается, что в эмбриогенезе центральная зона развивается из материала вольфова протока (McNeal, 1968), в отличие от остальной части ПЖ, развивающейся из МПС. Центральная зона состоит из главных желёзок, выстланных многорядным эпителием, образующим складки. Вблизи уретры однослойный эпителий сменяется переходным. Многорядный эпителий желёзок образуется люминальными (секреторными), базальными и нейроэндокринными клетками. По сравнению с другими зонами, в центральной зоне люминальные клетки обладают более тёмной цитоплазмой, заполненной множеством гранул, крупным ядром (McNeal, 1988). Люминальные клетки отделяются от подлежащей стромы слоем базальных клеток. Эти уплощённые клетки обладают тёмным ядром и слабо развитой цитоплазмой. Базальные клетки не аналогичны миоэпителиальным клеткам молочной железы, предполагаемая функция данных клеток заключается в воспроизведении и дальнейшем развитии в люминальные клетки. Базальные клетки на иммуногистохимических препаратах не окрашиваются на ПСА и

КПФ (McNeal, 1988). В эпителии также присутствует небольшое количество нейроэндокринных клеток, содержащих гранулы с серотонином, соматостатином и другими нейроэндокринными факторами.

Нежелезистая часть в основном расположена в ПЖ антеромедиально. Нежелезистый компонент ПЖ представлен препростатическим сфинктером, сфинктером уретры, фиброзно-мышечной стромой и капсулой простаты, нервами и сосудами. Препростатический сфинктер препятствует обратному току семенной жидкости от дистального сегмента уретры (McNeal, 1988). Сзади от уретры сфинктер имеет компактную структуру, а спереди расширяется и смешивается с мелкими протоками и концевыми участками желез медиальной части промежуточной зоны. Волокна сфинктера спереди не формируют замкнутых колец, оканчиваясь в фиброзно-мышечной строме. Латерально строма сливается с капсулой и покрывает передние границы периферической зоны. Проксимально, строма контактирует с препростатическим сфинктером и промежуточной зоной, дистально – со сфинктером уретры. Гладкомышечные волокна, преобладающие в составе стромы, располагаются хаотично. Строма может подвергаться атрофии, возможно связанной со снижением уровня экспрессии андрогенов. Атрофия обычно характерна для пациентов старше 70 лет и характеризуется уменьшением секреторных клеток, снижением секреции ПСА и КПФ. Ядра стромальных клетки становятся мелкими, цитоплазма практически отсутствует. Атрофии могут подвергаться желёзки центральной зоны, при этом изменения не затрагивают периферическую и промежуточную зону (McNeal, 1988).

Кровоснабжение ПЖ осуществляется многочисленными артериальными ветвями, проникающими через капсулу ПЖ и распространяющимися между протоками главных и слизистых желёзок. Иннервация ПЖ происходит за счёт автономных ганглиев. Симпатические сигналы поступают от подчревного нерва, а парасимпатические – от тазового нерва (White et al., 2013).

1.2. Клеточный состав железистого и стромального компартмента ПЖ, маркеры эпителиальных и стромальных клеток ПЖ

В ПЖ выделяют два компартмента: стромальный и железистый. Стромальный компонент представлен клетками мезенхимной природы. Железистый компонент образован несколькими популяциями эпителиальных клеток. Взаимное влияние двух компартментов друг на друга обуславливает нормальное развитие и функционирование

ПЖ (Cunha et al, 1987).

Эпителиальные клетки ПЖ разделяются на три типа, в зависимости от морфологии клеток, их локализации и экспрессируемых маркеров: базальные, люминальные и нейроэндокринные клетки (Abate-Shen & Shen, 2000). Базальные клетки лежат на базальной мембране в 1-2 слоя и варьируют от уплощённых клеток с конденсированным хроматином до кубических клеток с большим объёмом цитоплазмы и деконденсированным хроматином (Taylor et al., 2010). Главная функция базальных клеток – защита люминальных клеток от воздействия возможно негативных факторов окружающей стромы и, как предполагается, воспроизведение популяции эпителиальных клеток. В ПЖ базальные клетки формируют сплошной слой, их количество примерно соответствует количеству люминальных клеток (El-Alfy et al., 2000). Lee выделил семь субпопуляций базальных клеток на основе экспрессии таких маркеров, как p63, ЦК14 и ЦК5 (Lee et al., 2014).

Базальные клетки выявляются иммуногистохимически в нормальной ПЖ и отсутствуют при озлокачествлении. Базальные клетки, в отличие от люминальных, не экспрессируют ПСА, КПФ и АР. Таким образом, базальные клетки не выделяют секрет и развиваются андроген-независимо. Базальные клетки экспрессируют высокомолекулярные кератины – ЦК5 и ЦК14, CD44, интегрин $\alpha 6 \beta 1$ и p63 (Signoretti et al., 2000). В базальных клетках обнаружены факторы, препятствующие повреждению ДНК, например, глутатион-S-трансфераза и антиапоптотический фактор Bcl2 (De Marzo et al., 1998).

Другой популяцией эпителиальных клеток ПЖ являются люминальные (секреторные) клетки. Люминальные клетки обычно имеют цилиндрическую форму, обладают тёмной, заполненной гранулами цитоплазмой. Главная функция люминальных клеток – секреция таких факторов, как ПСА и КПФ (Jaworska et al., 2015). Отличительные особенности люминальных клеток – экспрессия низкомолекулярных кератинов ЦК8 и ЦК18, андрогенового рецептора, CD57 и Nkx3.1 (Liu et al., 1997; Bhatia-Gaur et al., 1999).

Самой малочисленной популяцией эпителиальных клеток ПЖ являются нейроэндокринные клетки, они составляют менее 1% всего эпителия ПЖ (Amorino et al., 2004). Нейроэндокринные клетки изредка встречаются в слое базальных клеток, их происхождение остаётся неясным. В ранних работах высказывалось предположение, что нейроэндокринные клетки выселяются из нервного гребня (Aumuller et al., 1999). Сейчас общепринятой точкой зрения является энтодермальное происхождение этих клеток (Andrew et al., 1983). Функцией нейроэндокринных клеток считается поддержание роста

люминальных клеток посредством выделения различных паракринных факторов (Abrahamsson, 1999). Данная популяция клеток является андроген-независимой, в них найдены хромогранин А, серотонин, синаптофизин, кальцитонин (Abate-Shen et al., 2000). В норме очень редкие, при раке ПЖ нейроэндокринные клетки увеличиваются в числе. При мелкоклеточном раке ПЖ опухолевые очаги образованы целиком нейроэндокринными клетками. Кроме того, была выделена популяция «промежуточных» клеток, для которых характерны маркеры как базальных, так и люминальных клеток (De Marzo et al., 1998). Такие клетки экспрессируют одновременно ЦК8, ЦК18, ЦК5 и ЦК14.

Основными компонентами стромы являются фибробласты, миофибробласты и ГМК. В строме также присутствуют иммунные клетки, кровеносные сосуды, лимфатические сосуды, нервы и внеклеточный матрикс (Hägglöf et al., 2012). Клетки стромы вырабатывают ростовые факторы, синтезируют компоненты внеклеточного матрикса. Стромальные клетки экспрессируют AP, рецепторы эстрогенов, 5-α редуктазу. Фибробласты экспрессируют виментин и ламинин, а ГМК – десмин, α-актин, миозин, дистрофин и другие белки. Отличительная черта миофибробластов – экспрессия проколлагена-1 (Niu et al., 2009).

1.3. Стволовые клетки ПЖ

Стволовые клетки – недифференцированные клетки, способные к самоподдержанию и дифференцировке в зрелые специализированные клетки (Tuch, 2006). Стволовые клетки могут делиться симметрично и асимметрично. При асимметричном делении образуется клетка, идентичная материнской, что обеспечивает поддержание популяции СК, и клетка, вступающая на путь дифференцировки.

Есть два типа стволовых клеток: эмбриональные стволовые клетки, дающие начало всем типам клеток и являющиеся плюрипотентными, и неэмбриональные стволовые клетки с ограниченной способностью к дифференцировке (Tuch, 2006).

Впервые идея о существовании стволовой клетки ПЖ была изложена в работе Isaacs and Coffey, наблюдавших регенерацию ПЖ у крысы после атрофии, вызванной кастрацией (Isaacs and Coffey, 1989). В настоящее время существует две точки зрения на происхождение СК ПЖ, в качестве их источника полагаящие либо базальные, либо люминальные клетки. Однозначное определение происхождения СК затруднено, так как, с одной стороны, при раке ПЖ слой базальных клеток исчезает, а с другой стороны, хотя раковые клетки имеют люминальный фенотип, некоторые свойства отличают их от

нормальных люминальных клеток.

Существующие модели, описывающие дифференцировку СК в ПЖ, можно разделить на три типа: линейная иерархическая модель, двунаправленная иерархическая модель и неиерархическая модель (Taylor et al., 2010). Линейная иерархическая модель констатирует, что СК ПЖ относятся к популяции базальных клеток. Эти СК делятся асимметрично, давая начало новой СК и клетке-предшественнице эпителиальных клеток. Двунаправленная иерархическая модель аналогична модели, описывающей СК молочной железы мыши. Для этой модели характерно наличие общей СК промежуточного типа, дающей начало клетке-предшественнице, из которой впоследствии развиваются базальные и люминальные клетки. Неиерархическая модель принципиально отличается от иерархических моделей. Последние предполагают, что СК относится к определённому типу клеток, базальному или промежуточному. Но открытие СК среди люминальных клеток может означать существование нескольких независимых типов СК, дающих начало каждому из трёх типов эпителиальных клеток.

Сторонники как люминального, так и базального происхождения СК ПЖ, обладают доказательствами, подкрепляющими их точку зрения. Изначально в составе эпителиального компартмента ПЖ выделяли две популяции клеток: базальные и люминальные. В дальнейшем, при анализе экспрессии цитокератинов была выявлена популяцию переходных клеток, совмещавших базальный и люминальный фенотипы (Verhagen et al., 1992). Исходя из полученных данных, некоторые авторы (De Marzo et al., 1998) предположили, что в эпителии ПЖ существует компартмент СК в составе популяции базальных клеток. Предполагается, что эти клетки дают начало популяции активно делящихся переходных клеток, которые, будучи полипотентными и андроген-чувствительными, дают начало базальным, люминальным и, возможно, нейроэндокринным клеткам. Маркером переходных клеток является CD24 (Verhagen et al., 1992). Однако недостатком гипотезы, предполагающей важную роль переходных клеток, является их ограниченное наблюдение: эти клетки выявляются *in vitro* (Peehl, 2005), но очень редко *in vivo*.

Считается, что базальные клетки выполняют защитную функцию по отношению к люминальным клеткам, ограждая их от окружающей стромы. В сравнении с люминальными, базальные клетки имеют большее сходство с мезенхимным фенотипом и интенсивнее экспрессируют гены, связанные с эпителиально-мезенхимным переходом (ЭМП). Например, miR-200, позитивно регулирующий E-кадгерин, экспрессируется в базальных клетках слабее, чем в люминальных (Park et al., 2008).

Одним из доказательств базального происхождения СК служат эксперименты с использованием флуоресцентной сортировки клеток (FACS), инфицированных лентивирусом, экспрессирующим несколько онкогенов: опухоль при этом развивается лишь из базальных клеток (Lawson et al., 2010). Goldstein (Goldstein et al., 2010) выделил маркер, характерный для СК в составе базальных клеток – Trop2 (Goldstein et al., 2008).

Аргументом сторонников базального происхождения СК ПЖ является отсутствие корреляции между фенотипом опухолевых клеток и их клеточным происхождением. Так, Min в эксперименте по трансформации базальных эпителиальных клеток линии PrEC с помощью онкогенных сигналов наблюдал развитие опухоли, клетки которой обладали люминальным фенотипом (Min et al., 2010). Stoyanova (Stoyanova et al., 2013) показана возможность развития опухоли ПЖ с люминальным фенотипом из трансформированной базальной клетки.

Существуют доказательства, подтверждающие люминальное происхождение СК ПЖ. В опытах Wang (Wang et al., 2010) были выявлены люминальные клетки, экспрессирующие маркер СК – Nkx3.1. Такие клетки обнаруживали способность к самообновлению и индукции регенерации ПЖ при трансплантации иммунодефицитным мышам. Развитию карциномы способствовала делеция *PTEN* в таких клетках. В отсутствие фосфатазы Pten активирует фосфотидилинозитоловый сигнальный путь и увеличивает экспрессию ТФ ERG на фоне хромосомных транслокаций (Tomlins et al., 2005).

Хотя клетки опухоли могут экспрессировать маркеры базальных клеток, отличительной чертой рака ПЖ является потеря базального слоя клеток (Bostwick, 1996). Кроме того, ПСА, уровень экспрессии которого увеличивается при раке ПЖ, выделяют исключительно люминальные клетки, поэтому можно предположить, что карцинома хотя бы частично состоит из люминальных клеток. Данный факт можно объяснить происхождением раковых клеток из переходных (De Marzo et al., 1998) или дедифференцировкой люминальных клеток с приобретением фенотипа, характерного для базальных клеток. Доказательством существования СК в популяции люминальных клеток служат опыты Korsten на *PTEN*-нокаутных мышах; клетки опухоли характеризовались сверхэкспрессией ЦК8, ЦК19 и Sca-1 (Korsten et al., 2009). Эти маркеры ассоциированы с предшественниками люминальных клеток.

В настоящее время исследователи, помимо СК ПЖ, выделяют ещё стволовые раковые клетки (СРК) ПЖ. СК обнаруживаются в ткани в очень небольшом количестве, в отличие от СРК, иногда представляющих значительную часть клеток опухоли (Jiang et al.,

2012). СРК во многом похожи на нормальные СК: они самообновляются, экспрессируют те же маркеры, но их деление не находится под строгим контролем.

Существует две теории, объясняющие механизм возникновения опухоли. Согласно стохастической теории, любая клетка опухоли может индуцировать опухолеобразование. Другая теория – иерархическая, предполагает наличие в опухоли небольшой популяции клеток, так называемых СРК, способных вызывать образование опухоли.

Возникновение СРК объясняется тремя гипотезами. Первая предполагает, что СРК возникают из нормальных СК вследствие генетических мутаций. Вторая гипотеза утверждает, что СРК развиваются из других клеток, переживающих дедифференцировку в ходе ЭМП (Mani et al., 2008). Третья гипотеза рассматривает СРК как индуцированные СК (Corominas-Faja et al., 2013). В регуляции СРК важную роль играет микроокружение, взаимодействие опосредуется выделением изменённых эндокринных и паракринных сигналов.

Основными маркерами СРК являются CD24, CD44, CD49f, CD133, CD166, $\alpha\beta 1$ -интегрин (Jaworska et al., 2015). CD133 – маркер СРК, характерный для нормальных СК, но, в отличие от них, СРК ПЖ не обязательно обладают функциональным CD133 (Bauer et al., 2008). Однако Vander Griend считает, что источником рака ПЖ являются АР-позитивные клетки, не являющиеся стволовыми в нормальной ткани. Маркер CD133 стабильно не экспрессируется в этих клетках, а ассоциирован с приобретением свойств стволовой клетки (Griend et al., 2008).

Интересны данные о существовании не только эпителиальной, но и стромальной СК. Так, в опытах Lin по изучению первичных культур стромальных клеток аденомы ПЖ была показана дифференцировка стромальных клеток по типу МСК. Эти клетки экспрессировали CD44, CD34 и другие маркеры СК (Lin et al., 2007).

1.4. Взаимодействие эпителиальных и стромальных клеток ПЖ в норме и при возникновении рака

Для нормального развития ПЖ необходимо взаимодействие мезенхимных и эпителиальных клеток, поддерживаемое во взрослом состоянии. Взаимное развитие мезенхимы и эпителия обуславливает развитие ПЖ в ходе эмбриогенеза. Под действием андрогенов мезенхима мочевого пузыря даёт начало эпителиальным клеткам, которые начинают экспрессировать АР. В свою очередь, развивающийся эпителий ПЖ индуцирует развитие гладкой мускулатуры из ткани синуса (Cunha et al., 1992). ГМК в своём развитии,

а также во взрослом состоянии, зависимы от андрогенов, воспринимаемых посредством рецептора (Hayward et al., 1996). Зависимость ГМК от андрогенов и сигналов эпителия сохраняется во взрослом состоянии.

Роль эпителия ПЖ в индукции развития ГМК была показана на опытах с трансплантацией мезенхимы МПС под почечную капсулу взрослой мыши на срок в 4 недели. Такой трансплантат давал начало небольшому количеству ГМК. Напротив, при трансплантации мезенхимы с эпителием ПЖ, развивалось нормальное количество ГМК вокруг протоков желёз (Cunha, 1992). В опытах по трансплантации человеческого эпителия ПЖ в МПС крысы, ГМК развивались сходно с человеческим организмом (Hayward, 1998), что показывает роль эпителия в развитии стромы.

Нарушение нормальных эпителиально-мезенхимных взаимодействий может приводить к развитию новообразований, в том числе и злокачественных. При развитии рака ПЖ и стромальные, и эпителиальные клетки изменяют набор экспрессирующихся молекул. Так же, как утрата экспрессии Е-кадгерина эпителиальными клетками при раке ПЖ, маркерами развития опухоли в стромальных клетках может служить увеличение экспрессии N-кадгерина и кадгерина-11 (Tomita et al., 2000). При раке ПЖ и в стромальных, и в эпителиальных клетках наблюдается сверхэкспрессия TGF β . Ингибирование TGF β -сигнального пути посредством «выключения» рецептора T β RII ведёт к метастазированию (Tu et al., 2003). Другим признаком развития рака является ангиогенез, таким образом опухолевые клетки получают питательные вещества и приобретают возможность метастазирования (De Wever et al., 2003). Факторы, индуцирующие образование сосудов, выделяются как стромальными, так и эпителиальными раковыми клетками. Ключевыми факторами индукции ангиогенеза являются VEGF, FGF, ИЛ-8, TGF β (Carmeliet et al., 2000).

Взаимодействие нормальных и раковых клеток может быть опосредовано как прямыми межклеточными контактами, так и секретлируемыми факторами (Hazan et al., 1997). De Wever и Mareel была предложена модель эфферентных и афферентных взаимодействий стромальных и раковых клеток (De Wever et al., 2003). Эфферентное взаимодействие подразумевает индукцию стромы посредством выделяемых раковыми клетками факторов TGF β , PDGF, вызывающих либо дифференцировку клеток в фибробласты и миофибробласты, либо индуцирующих ЭМП. ЭМП, сопровождаемый увеличенной экспрессией виментина и сниженной – кальпонины, также приводит к образованию миофибробластов (Tuxhorn et al., 2002). Кроме того, раковые клетки могут индуцировать опухолеобразование в строме.

При афферентных взаимодействиях сигналы идут от изменённых стромальных клеток к раковым. Такие стромальные клетки способствуют подвижности клеток, их распространению, за счёт подавления апоптоза и выделения различных сигналов (Niu et al., 2009). Показано ингибирование опухолеобразования при инокулировании раковых стромальных клеток нормальными фибробластами. Обратный эффект даёт культивирование раковых клеток стромы с неонкогенным эпителием (Hayward et al., 2001). Таким образом, заметную роль в развитии рака ПЖ могут играть фибробласты.

Растворимые факторы, выделяемые стромальными клетками, оказывают паракринное воздействие и могут работать вместе с другими сигнальными молекулами, например, компонентами ВКМ или интегринами, стероидными гормонами и их рецепторами. Такое комплексное воздействие может ускорять опухолеобразование. Взаимодействие, опосредованное компонентами внеклеточного матрикса и молекулами клеточной адгезии, может регулировать адгезионные и миграционные свойства клеток (Niu et al., 2009). При развитии рака барьер, представленный компонентами ВКМ, разрушается ферментами, которые выделяют стромальные клетки. С белками ВКМ могут связываться интегрины, в норме «заякоривающие» клетки, однако при раке их роль не так однозначна: в работе Jin показана кооперация интегринов с сериновыми протеазами и металлопротеазами, что влечёт за собой миграцию и инвазию клеток (Jin et al., 2004).

Основными факторами, обеспечивающими взаимодействие стромы и эпителия являются PDGF, TGF β , IGF-1, HGF, FGF, ИЛ-6, CXCL12 (Niu et al., 2009). Фактор PDGF экспрессируется фибробластами, нейронами, эндотелиальными клетками и эпителием. PDGF стимулирует TGF β и индуцирует дифференцировку миофибробластов, стимулирует выработку факторов IGF-1, HGF, FGF2 и эндотелина-3. PDGF рассматривается как хемоаттрактант для мезенхимных клеток. Показана связь PDGF с индукцией ЭМП, ангиогенеза и миграцией клеток (Niu et al., 2009).

IGF-1 синтезируется преимущественно стромальными клетками ПЖ, а его рецептор (IGF-1R) экспрессируется клетками эпителия. Посредством IGF-1 индуцируется пролиферация эпителиальных клеток, а сверхэкспрессия этого фактора свидетельствует о трансформации клеток у грызунов. Чувствительность эпителиальных клеток к IGF-1 объясняется также его связью с AP. IGF-1 способен активировать гены, экспрессия которых зависит от андрогенов, в раковых клетках. (Wu et al., 2006).

Другим важным фактором, регулирующим стромально-эпителиальные взаимодействия является HGF. HGF – паракринный фактор, экспрессируемый стромальными клетками и взаимодействующий с рецептором c-met на эпителиальных

клетках. HGF регулирует рост, подвижность клеток и ангиогенез. По данным Knudsen с-met рецептор был обнаружен на 50% раковых клеток и почти во всех метастатических поражениях (Knudsen et al., 2004). HGF индуцирует экспрессию BMP-7 и его рецептора. Экспрессия с-met блокируется андроген-зависимыми сигналами. При блокировании экспрессии AP и с-met рост опухолевых клеток заметно снижался, что может свидетельствовать о роли с-met в андроген-независимом развитии рака ПЖ (Maeda et al., 2006).

Семейство FGF белков в ПЖ представлено FGF1, FGF2, FGF6, FGF8 и FGF7, экспрессия которых в стромальных клетках понижена при раке. Эти факторы являются паракринными и/или аутокринными. Рецепторы к FGF экспрессируются эпителиальными клетками. FGF играют роль при опухолеобразовании, так как запускают несколько сигнальных путей: PI3K-ассоциированный, связанный с фосфолипазой C и MAPK путь (Niu et al., 2009).

Другими факторами, опосредующими эпителиально-мезенхимные взаимодействия, являются EGF, CXCL12/SDF-1 (stromal cell-derived factor-1), кавеолин 1, интерлейкин-6 (ИЛ-6). В работе Oosterhoff показана способность EGF активировать транскрипцию андроген-зависимых генов даже в отсутствии андрогенов (Oosterhoff et al., 2005). CXCL12/SDF-1 – хемокин мезенхимных клеток, взаимодействующий с рецептором CXCR4 на мембране раковых клеток. Экспрессия CXCR4 характерна для агрессивных опухолей, начавших метастазирование. CXCL12 способствует выживанию раковых клеток и индуцирует ангиогенез, привлекая эндотелиальные клетки к новообразованию (Niu et al., 2009).

ИЛ-6 в основном секретируется стромальными клетками, хотя его рецептор обнаружен на эпителиальных и стромальных клетках. ИЛ-6 способен активировать AP при отсутствии андрогенов. Экспрессия ИЛ-6 при раке увеличена (Niu et al., 2009).

При развитии рака ПЖ строма становится реактивной: увеличивается количество фибробластов и миофибробластов, уменьшается число ГМК. Изменённое микроокружение опухоли помогает ей уйти от иммунного надзора и гормонального контроля, что влечёт за собой развитие андроген-независимой формы рака (De Wever et al., 2003). Белок FAP (α -белок, активирующий фибробласты), мембран-ассоциированный гликопротеин, обладающий серин-протеазной активностью, который экспрессируется в норме фибробластами, в реактивной строме характеризуется сверхэкспрессией, эпителиальные клетки данный маркер не несут (Niu et al., 2009).

Миофибробласты – гетерогенная популяция клеток, основным источником которой

являются фибробласты. В опытах Rønnov-Jessen источником миофибробластов при раке молочной железы помимо фибробластов были ГМК сосудов и гораздо реже – перициты. (Rønnov-Jessen et al., 1995). В развитии миофибробластов ключевую роль играют факторы TGF β и PDGF. PDGF способствует образованию миофибробластов путём стимуляции выработки TGF β макрофагами, в то же время TGF β способствует превращению клеток напрямую. Другими факторами, стимулирующими образование миофибробластов, могут быть эндотелин-1 и тромбин (Niu et al., 2009).

Взаимодействие с эпителиальными клетками определяет и уровень экспрессии AP в нормальных стромальных клетках. В присутствии эпителия, уровень AP повышается, если эпителиальные клетки трансформированы – количество AP резко снижено (Cano et al., 2007).

1.5. ЭМП и его роль в механизме злокачественной трансформации ПЖ

Эпителиально-мезенхимный переход – процесс, в ходе которого эпителиальные клетки приобретают признаки мезенхимных клеток. ЭМП начинается с разрушения межклеточных контактов, вследствие чего клетки теряют апикально-базальную полярность и приобретают способность к миграции. ЭМП – комплексный процесс, характеризующийся изменением формы клетки, перестройкой цитоскелета и изменением паттерна экспрессирующихся генов. В некоторых случаях клетки могут сохранять изначальные эпителиальные свойства, тогда такой ЭМП называется неполным (Lamouille et al, 2014).

ЭМП классифицируется на 3 типа (Kalluri & Weinberg, 2009). Первый тип ЭМП характерен для эмбрионального развития, в частности для гаструляции. Образующиеся мезенхимные клетки могут превращаться обратно в эпителий путём обратного ЭМП процесса – мезенхимно-эпителиального перехода (МЭП). Таким образом формируются вторичные эпителии (Chaffer et al., 2007). Второй тип ЭМП ассоциирован с застарением травмированных тканей путём индукции образования фибробластов (Zeisberg et al., 2007). Если данный тип ЭМП поддерживается достаточно долго, может развиваться фиброз, приводящий к нарушению функционирования органа (Kim et al., 2006). Третий тип ЭМП связан с опухолеобразованием, когда эпителиальные клетки становятся инвазивными и приобретают способность к метастазированию (Thiery, 2002). Важную роль ЭМП играет в развитии рака ПЖ.

ЭМП всех типов протекает сходно. Разрушаются адгезионные и щелевые контакты, участки базальной мембраны. Подавляется экспрессия Е-кадгерина, образующего адгезионные контакты, вместо него экспрессируется N-кадгерин. Происходят перестройки в цитоскелете: вместо цитокератинов экспрессируются виментин и фибронектин, на периферии клетки формируются актиновые стресс-фибриллы. Клетки из полигональных становятся веретеновидными, приобретают способность реагировать на внеклеточные сигналы, направляющие их миграцию и препятствующие апоптозу (Micalizzi et al., 2010). В регуляции ЭМП участвуют транскрипционные факторы (ТФ) Snail1, Snail2 (Slug), Twist, ZEB1, ZEB2.

Snail 1 и Slug относятся к семейству транскрипционных факторов Snail. Эти ТФ негативно регулируют экспрессию Е-кадгерина, связываясь с Е-боксами в его промоторе (Sánchez-Tilló et al., 2012). Также, Snail1 снижает экспрессию других белков межклеточных контактов: клаудина, окклюдина, ZO-1 (Smith et al., 2012), способствует увеличению экспрессии мезенхимных маркеров: виментина, фибронектина, матриксных металлопротеаз; а также других ТФ – ZEB-1 и ZEB-2. В ПЖ Snail1 регулирует прохождение контрольной точки G1/S, подавляет транскрипцию циклина D2, индуцирует синтез p21 (Liu et al., 2010). В период эмбрионального развития Slug экспрессируется в дорсальной части нервной трубки, способствуя миграции клеток мезодермы из нервного гребня (Esposito et al., 2015). В постнатальный период Snail1 и Slug экспрессируются в ряде органов, включая ПЖ, а их сверхэкспрессия характерна для опухолей. Экспрессия ТФ семейства Snail контролируется различными ростовыми факторами, в том числе TGFβ, белками WNT и Notch (Liu et al., 2010).

Twist содержит домен "спираль-петля-спираль", необходимый для димеризации. Функционирующий Twist связывается с последовательностью NdeI E-box в регуляторных элементах генов-мишеней. На С-конце белка Twist находится твист-бокс, ответственный за активацию транскрипции N-кадгерина и подавление экспрессии Е-кадгерина (Qin, 2012). Активность ТФ Twist регулируется связыванием с другими ТФ, пост-транскрипционными модификациями, уровнем кислорода (Grant et al., 2013). Факторы Snail и Twist индуцируют развитие мезенхимных клеток с фенотипом CD44^{high}CD24^{low}, характерным для эпителиальных СК (Mani et al., 2008). ZEB1 и ZEB2 – ТФ со структурой «цинковые пальцы», способные связываться с промоторами генов-мишеней, например, Е-кадгерина, и подавлять его экспрессию (Vandewalle et al., 2009). ТФ ZEB играют важную роль в эмбриогенезе и участвуют в формировании опухолей (De Craene et al., 2013).

Индукторами ЭМП в ПЖ служат такие факторы, как EGF, TGFβ,

транскрипционные факторы Snail, Slug, Twist. Источником этих сигналов может быть строма, активно производящая цитокины, ростовые факторы и компоненты внеклеточного матрикса (Matuszak et al., 2011). Фактор TGF β индуцирует пролиферацию мезенхимных клеток, но ингибирует рост эпителиальных клеток (Grant et al., 2013).

Ключевую роль в нормальном развитии ПЖ играет АР: в отсутствии андрогенов ПЖ не развивается. При раке ПЖ АР активно экспрессируется, а его активация ведёт к пролиферации раковых клеток. При инактивации АР клетки не могут реплицировать ДНК и вступают в апоптоз. (Liu et al., 2010). Kyprianou показана связь между андроген-индуцированным ЭМП и низким уровнем экспрессии АР, что позволяет предположить влияние низкого уровня экспрессии АР на инвазию трансформированных клеток (Kyprianou et al., 2005; Matuszak et al., 2011). Два сигнальных пути – Wnt/ β -катенин и АР имеют точки пересечения. В нормальных клетках ПЖ β -катенин обнаруживается в мембране, а в клетках, прошедших ЭМП, – в цитоплазме и ядре (Matuszak et al., 2011). β -катенин участвует в межклеточной адгезии в комплексе с кадгеринами. При разрушении межклеточных контактов β -катенин высвобождается и оказывается в цитоплазме, где в отсутствие сигналов Wnt, деградирует в протеасомах. β -катенин может обнаруживаться в ядре, где работает в качестве коактиватора генов андрогенного рецептора и *TCF/LEF* (T-cell factor/lymphocyte-enhancer factor) (Whitaker et al., 2008). Кроме того, β -катенин способен напрямую связываться с АР (Robinson et al., 2008). Уровень экспрессии β -катенина отражает состояние опухоли. Снижение и утрата экспрессии β -катенина и E-кадгерина наблюдается при первичном раке ПЖ, а увеличение экспрессии – при метастазировании в кости (Matuszak et al., 2011).

В ходе ЭМП в клетках ПЖ происходит переключение экспрессии кадгеринов (cadherin switching), когда E-кадгерин подменяется N-кадгерином (Wheelock et al., 2008). N-кадгерин экспрессируется в таких клетках, как ГМК, миофибробласты, эндотелий, нейроны, и участвует не только в формировании межклеточных контактов, но и в перестройках актинового цитоскелета, формировании подвижных структур клетки. При раке ПЖ увеличение экспрессии N-кадгерина связано с приобретением инвазивного фенотипа и переходом к метастазированию (Matuszak et al., 2011). Высокий уровень N-кадгерина – прогностический маркер рецидива у больных, перенёсших радикальную простатэктомию (Gravdal et al., 2007). Snail и Slug появляются в клетке в ответ на воздействие факторов Wnt, Lbx1, TGF β , при гипоксии и, помимо индукции ЭМП, способны регулировать экспрессию протеаз, белков щелевых контактов и разборку десмосом (Micalizzi et al., 2010).

ЭМП в раковых клетках ПЖ регулируется теми же ТФ, что и в других клетках, проходящих ЭМП. Обычно в опухолях ПЖ наблюдается высокий уровень экспрессии этих ТФ, например, в работе Liu показан высокий уровень экспрессии фактора Slug в опухолевой ткани в сравнении с нормальной (Liu et al., 2010). Ключевую роль играют ТФ Snail: у мышей в отсутствии фактора Snail подавление экспрессии E-кадгерина неполное: клетки сохраняют полярность и контакты (Micalizzi et al., 2010). Twist – маркер опухолей ПЖ, резистентных к лечению, его сверхэкспрессия служит признаком опухолей высокого уровня развития.

В агрессивных метастазирующих опухолях ПЖ может происходить МЭП, который индуцируется экспрессией малых РНК miR-200, miR-205, репрессирующих экспрессию факторов ZEB1 и ZEB2. Кроме того, снижается экспрессия рецептора II типа к TGF β (T β RII), поэтому блокируется TGF β -зависимый путь индукции ЭМП (Lamouille et al., 2014).

1.6. Роль сигнального пути Wnt/ β -катенин в развитии рака предстательной железы

Сигнальный путь Wnt/ β -катенин играет важную роль в эмбриональном развитии и гомеостазе тканей взрослого организма, регулируя дифференцировку, пролиферацию и функционирование клеток. Нарушения сигнального пути Wnt/ β -катенин ассоциированы с развитием рака, в том числе рака ПЖ (Clevers, 2006). Семейство Wnt насчитывает 19 секреторных цистеин-богатых белков. Различают канонический и несколько неканонических сигнальных путей, индуцированных белками Wnt. Канонический сигнальный путь связан с регуляцией пролиферации и дифференцировки клеток, а неканонические регулируют уровень внутриклеточного кальция и перестройку актинового цитоскелета (Johnson, 2006).

Отличительная черта канонического сигнального пути Wnt/ β -катенин – участие β -катенина. В отсутствие сигналов Wnt β -катенин фосфорилируется казеиновой киназой 1 α (CK1 α), входящей в состав деструктивного комплекса вместе с Gsk3 β , аксином и белком APC (adenomatous polyposis coli). Фосфорилированный β -катенин узнаётся убиквитин-лигазой – белком β -Trcp (β -transducin repeat-containing protein) и направляется в протеасомы для деградации. Низкий уровень ядерного β -катенина поддерживается за счёт его экспорта в цитоплазму аксином и APC. В отсутствие аксина, играющего роль скэффолда в деструктивном комплексе, β -катенин может избегать фосфорилирования и

деградации (Yardy et al, 2005). В каноническом сигнальном пути белки Wnt связываются с рецепторами Frizzled и корецепторами Lrp5/6 и Lgr4-6. Активность этого комплекса может регулироваться белками R-спондином и Wise. От рецептора сигнал проводится белком Dishevelled (Dvl), полимеризующимся после взаимодействия с рецептором. Фосфорилирование цитоплазматических доменов LRP5/6 и образование полимерного Dvl способствует перемещению аксина к плазматической мембране и инактивации деструктивного комплекса. В итоге β -катенин, накапливающийся в цитоплазме, транспортируется в ядро, где он взаимодействует с ТФ TCF/LEF. Белки TCF/LEF связывают консенсусную последовательность A-C/G-A/T-T-C-A-A-A-G, которая называется Wnt-респонсивным элементом. Связывание TCF/LEF с β -катенином активирует транскрипцию многочисленных генов белков, среди которых находятся циклин D1, MMP-7, CD44, эндотелин-1, фибронектин, AP. Таким образом регулируется клеточный цикл, миграция клеток, приобретение способности к метастазированию. Без активации β -катенином TCF/LEF в комплексе с белками Groucho и CtBP остаются связанными с промоторными и энхансерными областями генов, блокируя их транскрипцию (Kharaishvili et al, 2011).

Неканонические сигнальные пути Wnt/ β -катенин подразделяются на Wnt/Ca²⁺, Wnt/Jnk и Wnt/Rho. В этих путях задействованы такие белки Wnt, как Wnt4, Wnt5a, Wnt11, которые не участвуют в каноническом сигнальном пути (Johnson, 2006).

β -катенин является компонентом адгезивного комплекса кадгерин/катенин, важного для формирования и функционирования ПЖ. Существуют два пула β -катенина: цитоплазматический и мембранный, связанные между собой. Разрушение адгезивного комплекса приводит к высвобождению β -катенина и активации Wnt/ β -катенин сигнального пути, который приводит в том числе к экспрессии Slug, ингибирующего экспрессию E-кадгерина. Эти события могут индуцировать ЭМП, следствием чего является увеличение подвижности и инвазия раковых клеток. Связь клеточной адгезии и сигнального пути Wnt/ β -катенин также показывает наличие конкуренции между E-кадгерином и TCF/LEF за связывание с β -катенином (Kupta et al, 2012).

Сигнальный путь Wnt/ β -катенин играет важную роль в развитии ПЖ в ходе эмбриогенеза, регулируя ветвление протоков желёзок, пролиферацию и дифференцировку эпителиальных клеток. При отсутствии Wnt5a развитие желёзок нарушается, а мРНК Wnt5a в норме экспрессируется в областях МПС, где происходит развитие протоков, и на их дистальном конце, где в дальнейшем происходит ветвление (Kharaishvili et al, 2011). Во взрослом организме сигнальный путь Wnt/ β -катенин участвует в поддержании функций

стволовых клеток, однако механизм такой регуляции в ПЖ неясен. В работе Bisson обнаружено, что под действием Wnt3a увеличивался размер и сильнее проявлялись СК-подобные свойства раковых клеток (Bisson et al, 2009).

Уровень экспрессии и расположение β -катенина зависят от состояния ПЖ. Считается, что для опухоли ПЖ характерно увеличение количества ядерного β -катенина, однако есть исследования, показывающие отличные результаты. В целом, причины ядерной локализации β -катенина при раке ПЖ не имеют чёткого объяснения, однако наличие β -катенина в ядре опухолевых клеток может свидетельствовать об определённой роли сигнального пути Wnt/ β -катенин в развитии рака. На мышинных моделях показана связь неоплазии ПЖ и трансформации эпителиальных клеток с образованием недеградируемой формы β -катенина. В различных исследованиях выявлялись мутации, затрагивающие остатки серина или треонина на N-конце β -катенина, при этом мутации наблюдались лишь в клетках очага опухолеобразования, что может свидетельствовать об их роли в развитии рака (Kharaishvili et al, 2011). При метастазировании увеличивается уровень экспрессии некоторых Wnt белков, например Wnt1, Wnt2, Wnt5a, и β -катенина. Wnt5a индуцирует увеличение уровня внутриклеточного кальция и САМКII при раке ПЖ, что в свою очередь ведёт к перестройке актинового цитоскелета и приобретению инвазивного фенотипа. При первичном раке ПЖ наблюдается снижение и дальнейшая утрата экспрессии β -катенина и Е-кадгерина, а при метастазировании в кость – обратная картина (Matuszak et al, 2011).

При раке ПЖ зачастую наблюдаются мутации в гене, кодирующем фосфатазу Pten. Потеря Pten приводит к активации PI3K-сигнального пути, приводящего в том числе к фосфорилированию Gsk3 β . В клетках рака ПЖ, не экспрессирующих Pten, обнаруживается высокий уровень экспрессии β -катенина (Francis et al, 2013).

При помощи дрожжевой двугибридной системы показано прямое взаимодействие β -катенина и AR, играющего ключевую роль в развитии и функционировании ПЖ. Следствием данного взаимодействия является увеличение транскрипции андроген-зависимых генов и репрессия транскрипции генов, ассоциированных с β -катенином и TCF/LEF (Kypka et, 2012). Под действием андрогенов увеличивается экспрессия β -катенина, он рекрутируется в ядро. Сверхэкспрессия β -катенина усиливает экспрессию AR. Кроме того, в промоторе гена AR есть участки связывания TCF/LEF, через которые эти факторы также могут индуцировать транскрипцию AR. Между AR и TCF/LEF существует конкуренция за связывание β -катенина, что влечёт за собой торможение транскрипции β -катенин-зависимых генов. Кроме того, AR может напрямую

взаимодействовать с TCF-4 (Amir et al, 2003).

Глава 2. Материалы и методы

2.1. Клеточные линии и культивирование клеток. В работе использовались первичные культуры стромальных клеток ПЖ человека, полученные путём культивирования на пластике в специальной среде клеток, выделенных из ткани простаты пациентов, подвергнутых простатэктомии по поводу рака простаты. В качестве контрольных клеток для сравнения экспрессии стромальных и эпителиальных маркеров использовали культуры стволовых клеток эндометрия человека (СКЭ), FetMSC (мезенхимные стволовые клетки из костного мозга 5-6-недельного эмбриона человека), MCF-7 (аденокарцинома молочной железы), A549 (карцинома лёгкого), HeLa (аденокарцинома шейки матки) первичные культуры эпителиальных клеток ПЖ человека. Все клеточные линии, кроме первичных культур ПЖ, культивировали на чашках Петри диаметром 100 мм до достижения плотности 90 –100 % в среде Игла, модифицированной Дульбекко (DMEM), с 10% фетальной бычьей сывороткой (ФБС) и 1% гентамицином в CO₂ инкубаторе в условиях 5% CO₂ и 100% влажности. Все первичные культуры клеток использовали на 2 – 7 пассажах включительно.

2.2. Получение первичных культур. Материал ПЖ человека получали из образцов ткани простаты пациентов, подвергшихся радикальной простатэктомии по поводу рака ПЖ в урологическом отделении 2-й городской клинической больницы Санкт-Петербурга в соответствии с протоколом этического комитета СПбГБУЗ «Городская многопрофильная больница № 2». Пробы, содержащие опухолевый узел или окружающую его нормальную ткань, помещали в пробирки с 5 мл стерильного физиологического раствора, содержащего 50 мг/мл гентамицина. Каждую из двух проб разделяли ножницами на две половины, одну из которых фиксировали в 10 мл 4%-ного параформальдегида в фосфатном буфере (pH – 7,4) для последующей гистологической обработки. Вторая проба предназначалась для получения первичных культур и дальнейшего иммунофлуоресцентного анализа. Фрагмент ткани из второй пробы переносили в стерильную 100 мм культуральную чашку, отмывали в 9 мл ФБР, измельчали ножницами до кусочков размером 1-2 мм и повторно отмывали в ФБР. Полученные кусочки помещали в пробирку с раствором коллагеназы, содержащей 310 мкл 0,28% коллагеназы (Sigma, США), 20 мкл ДНКазы I (New England Biolabs, Англия), 200 мкл 10% ФБС (Invitrogen, США) и 1470 мкл RPMI (Thermo Fisher Scientific, США). Пробирку инкубировали 18 ч в шейкере-инкубаторе при 37°C и 230 об/мин. Полученную суспензию стромальных клеток ресуспендировали в 9 мл PBS, осаждали 5 мин

центрифугированием при 1000 об/мин, клеточный осадок разделяли поровну. Одну половину осадка ресуспендировали в 4 мл среды SCGM (Lonza, США), содержащей 5% ФБС, 10 нг/мл bFGF, 5 мкг/мл инсулина, и 50 мкг/мл гентамицина, клетки культивировали на 60 мм чашках петри.

Другую половину осадка ресуспендировали в 4 мл с ростовой среды PrEGM, содержащей в 500 мл 2 мл экстракта гипофиза быка, 0.5 мл инсулина, 0.5 мл кортизола, 0.5 мл GA-1000, 0.5 мл ретиноевой кислоты, 0.5 мл трансферрина, 0.5 мл трийодтиронина, 0.5 мл эпинефрина и 0.5 мл EGF. Культуральные чашки предварительно покрывали трёхкратно 1,5 мл раствора коллагена, содержащего 1 мг/мл коллагена в 20 мм уксусной кислоте. Чашки с коллагеном выдерживали 30 мин при 37°C, меняя раствор коллагена на свежий и промывая поверхность чашек PBS. Культуры клеток культивировали в CO₂ инкубаторе в атмосфере 95% воздуха, 5% CO₂, и 100% влажности.

2.3. Пассирование клеток. Для пассирования клетки на чашках дважды отмывали 2 мл ФБР и отделяли от пластиковой поверхности с помощью раствора 0.25% трипсина с 1мМ ЭДТА (раствор Версена), который наносили на 100 мм чашку в объёме 1 мл на 5 мин. Отделённые от пластика клетки ресуспендировали в 5-10 мл РС и переносили на новые чашки. При плотности насыщения первичных культур 80-90% (% насыщения соответствует площади поверхности чашки, покрытой клетками) клетки разделяли 1:2 путём переноса на две 100 мм чашки. Клетки ПЖ человека культивировали до 10 пассажа. Продолжительность пассирования клеток ПЖ человека различалась на разных пассажах: 10-14 дней для первого пассажа, 7 дней для второго, с дальнейшим уменьшением до 2-3 дней.

2.4. Консервация и деконсервация клеток. Для консервации из культур клеток, растущих экспоненциально в 100 мм чашках Петри при достижении 90% плотности насыщения, удаляли ростовую среду, дважды промывали 2 мл фосфатного буфера (PBS) и добавляли 1 мл 0.25% трипсина с 1 мМ-версеном (1:1). Клетки инкубировали в течение 5 мин в CO₂-инкубаторе. Переносили суспензию с каждой чашки в ростовую среду, объём 3.5 мл, с добавлением 0.5 мл диметилсульфоксида. Клетки тщательно ресуспензировали, затем суспензию переносили в ампулы для криоконсервации, таким образом клетки с одной чашки при замораживании распределяли на 5 ампул. Ампулы замораживались в жидком азоте при температуре -196°C.

При деконсервации после размораживания ампул из жидкого азота их центрифугировали в течение 5 мин при 1000 об/мин, удаляли среду с консервантом, ресуспензировали клетки в свежей ростовой среде и переносили на чашки Петри

диаметром 60 мм. При достижении 90% плотности насыщения, клетки переносили на чашки диаметром 100 мм, в которых продолжалось дальнейшее культивирование. Криоконсервацию первичных культур клеток ПЖ человека осуществляли на 1 и 5 пассажах.

2.5. Иммунофлуоресцентное окрашивание. Клетки окрашивали по следующему протоколу: покровные стёкла с клетками, распластанными при росте в культуре, переносили в 35 мм культуральные чашки, клетки однократно отмывали PBS 5 мин, фиксировали 4%-ным параформальдегидом в течение ночи при +4°C; обрабатывали 0.2%-ым детергентом Тритон X-100 10 мин, промывали PBS 2 раза по 5 мин, сайты неспецифического связывания антител блокировали 1 ч раствором, содержащим 3% бычьего сывороточного альбумина (БСА) и 0.1 % Tween-20; затем на клетки наносили специфические антитела (Таблица 1) в блокирующем растворе на 1.5 ч при комнатной температуре, промывали 3 раза по 5 мин PBS, обрабатывали 1 ч при комнатной температуре видоспецифическими антителами, конъюгированными с флуоресцентной меткой, отмывали PBS 3 раза по 5 мин. Затем препараты заключали в среду SlowFade Gold (Invitrogen, США), уменьшающую неспецифическую флуоресценцию и содержащую краситель Dapi. Иммунофлуоресцентные изображения получали на электронном сканирующем микроскопе Leica TCS SP5 (Carl Zeiss, Германия), используя лазеры с длиной волны 405, 543 и 633 нм.

Таблица 1. Список антител, использовавшихся при иммунофлуоресцентном окрашивании.

Антиген и название антител	Фирма-производитель	Рабочее разведение
β-катенин (AK 768-781), кроличьи моноклональные,	Sigma, США	1:500
Е-кадгерин, мышинные моноклональные	BD Biosciences, США	1:1000
N-кадгерин, мышинные моноклональные	Thermo Fisher Scientific, США	1:100
ЦК8, мышинные моноклональные	ICN Immunobiological, USA	1:100
Slug, кроличьи поликлональные	Thermo Fisher Scientific, США	1:1000
Виментин, мышинные моноклональные	Thermo Fisher Scientific, США	1:1000

IgG кролика, козы поликлональные, конъюгат с Cy5 643	Invitrogen, США	1:500
IgG мыши, козы поликлональные, конъюгат с Cy3 543	Invitrogen, США	1:500
Панцитокератин (ЦК4, 5, 6, 8, 10, 13, 18), мышинные моноклональные	Calbiochem, США	1:100

2.6. Иммуногистохимическое окрашивание. Фрагменты ткани ПЖ человека предварительно фиксировали в формалине. С парафиновых блоков с помощью ротационного микротомы HM 340E (Thermo Fisher Scientific, Германия) получали срезы толщиной 2,5 мкм, которые монтировали на предметные стёкла с полилизинным покрытием Polysine slides (Thermo Fisher Scientific, Германия). Стекла помещали в термостат на ночь при 37°C для оптимальной адгезии срезов. Для депарафинирования и температурной демаскировки антигенов использовали однократные растворы буферов, разведенные из концентратов Dewax and HIER Buffer (15x) (Thermo Fisher Scientific, Германия). Депарафинирование и демаскировку проводили в устройстве PT Module (Thermo Shandon, Германия) по следующей схеме: препараты погружали в предварительно нагретый до 65°C буфер, нагревали до 98°C и поддерживали эту температуру в течение 30 мин, затем остужали буфер с погруженными в него препаратами до 65°C. После этого препараты ополаскивали в дистиллированной воде, обводили срезы гидрофобным карандашом Elite PAP Pen (Diagnostic Biosystems, США) и помещали в однократный раствор трис-буфера (1 x TBS) на 5 мин. Для постановки иммуногистохимической реакции использовали систему UltraVision Quanto Detection System (Thermo Fisher Scientific, Германия) в соответствии с инструкцией производителя: UltraVision Hydrogen Peroxide Block – 10 мин, 1xTBS – 2 смены по 5 мин, UltraVision ProtienBlock – 5 мин, 1xTBS – 2 смены по 5 мин, инкубация с первыми антителами, 1xTBS – 2 смены по 5 мин, Primary Antibody Amplifier Quanto – 10 мин, 1xTBS – 2 смены по 5 мин, HRP Polymer Quanto – 10 мин, 1xTBS – 2 смены по 5 мин, DAB Quanto – 5 мин.

Далее препараты ополаскивали в дистиллированной воде и докрашивали ядра гематоксилином в автоматическом режиме на аппарате Leica ST5020 (Leica Microsystems, Германия) по следующему протоколу: гематоксилин Карацци (ЭргоПродакшн, Россия) – 3 мин, проточная вода – 1 мин, 1xTBS (для подсинивания ядер) – 2 мин, проточная вода – 1 мин, изопреп (ЭргоПродакшн, Россия) – 2 смены по 1 мин, ксилол (Вектон, Россия) – 3

смены по 1 мин. Окрашенные препараты заключали под покровные стекла в аппарате для автоматического заключения Leica CV5030 (Leica Microsystems, Германия),использував заключающую среду Leica CV Mount (Leica Biosystems, Германия).

Панцитокератин выявляли мышинными моноклональными антителами против ЦК 4, 5, 6, 8, 10, 13, 18, в разведении 1:10 (Calbiochem, США). N-кадгерин выявляли мышинными моноклональными антителами в разведении 1:100 (Thermo Fisher Scientific, США). Виментин выявляли мышинными моноклональными антителами против виментина человека в разведении 1:100 (Thermo Fisher Scientific, США). В качестве вторых антител использовали Fab-фрагмент козлиных и кроличьих иммуноглобулинов, конъюгированных с пероксидазой хрена, против легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов кролика или мыши (Jackson Immunolabs, США).

Глава 3. Результаты

3.1. Маркерный профиль контрольных клеточных линий

мезенхимного происхождения

В качестве контрольных клеток мезенхимного происхождения для сравнения характера продукции маркеров использовались клеточные линии FetMSC и СКЭ на 2 и 8 пассажах (Рисунок 1).

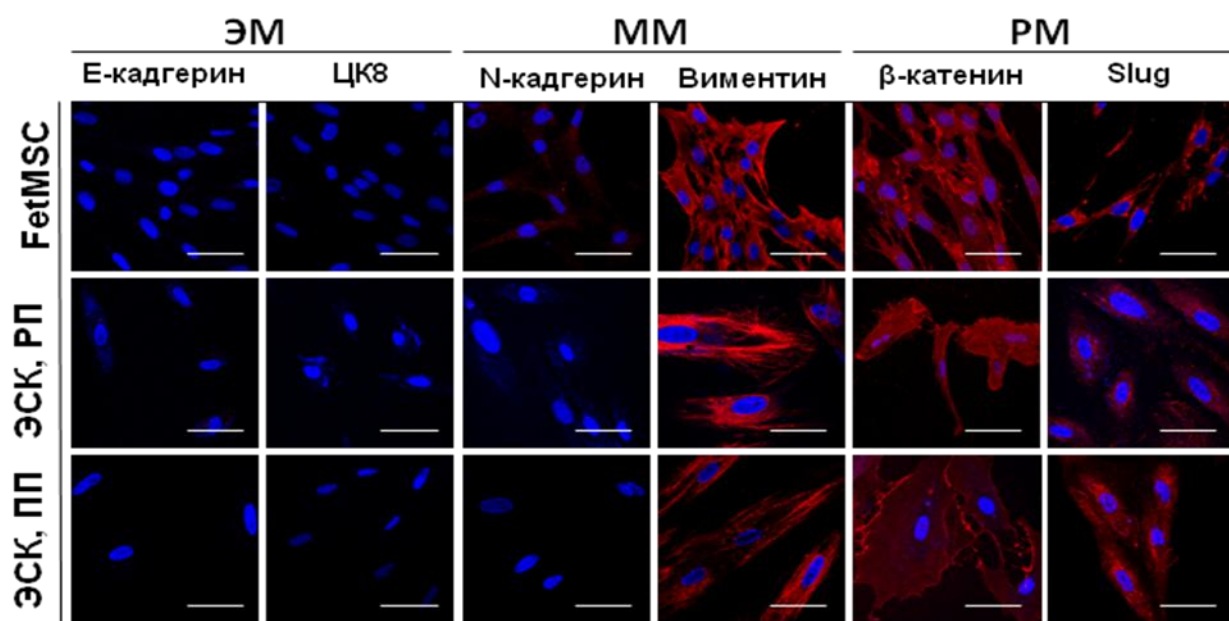


Рисунок 1. Продукция маркеров контрольными клеточными линиями мезенхимного происхождения. Изображения получены на конфокальном микроскопе Leica с помощью лазеров с длиной волны 405, 543 и 633 нм, увеличение объектива 40х, здесь и далее: ЭМ – эпителиальные маркеры; ММ – мезенхимные маркеры; РМ – регуляторные маркеры; РП – ранний пассаж; ПП – поздний пассаж. Масштабная линейка соответствует 60 мкм.

Для клеток данных линий характерно отсутствие синтеза эпителиальных маркеров (Е-кадгерин, ЦК 8), мезенхимные и регуляторные маркеры синтезируются на разном уровне и имеют различную локализацию. N-кадгерин синтезируется на низком уровне в FetMSC, но не синтезируется в СКЭ ни на 2, ни на 7 пассаже. Виментин синтезируется клетками обеих линий, однако, если в СКЭ на 2 пассаже выявляются фибриллы, образованные виментином, то на 7 пассаже фибриллярный рисунок менее выражен, а для FetMSC характерен высокий уровень синтеза белка, однако фибриллы виментина не выявляются. β -катенин выявляется во всех исследованных клетках преимущественно в цитоплазме, причём в FetMSC и СКЭ на 7 пассаже выявляется β -катенин,

предположительно ассоциированный с межклеточными контактами. β -катенин также обнаруживается в небольшом количестве в ядре всех исследованных клеток. Slug синтезируется исследованными клетками на разном уровне и выявляется преимущественно в цитоплазме. Уровень синтеза Slug в FetMSC и СКЭ 2 пассажа примерно одинаков, а СКЭ 8 пассажа синтезируют Slug на более высоком уровне, чем СКЭ 2 пассажа. Ядерная форма Slug характерна только для СКЭ 8 пассажа.

3.2. Маркерный профиль контрольных клеточных линий эпителиального происхождения

В качестве контрольных клеток эпителиального происхождения для сравнения характера продукции маркеров использовались клеточные линии A549, HeLa, MCF7 и первичная культура эпителиальных клеток, полученная из нормальной ткани ПЖ пациента №27 (Рисунок 2). Контрольные эпителиальные клеточные линии различаются по характеру и уровню синтеза маркеров. Эпителиальные маркеры выявляются во всех исследованных клетках, однако их уровень синтеза неодинаков. A549 продуцируют большое количество ЦК8, но малое – Е-кадгерина. Для HeLa характерен низкий уровень синтеза обоих эпителиальных маркеров, а в MCF7 Е-кадгерин и ЦК 8 продуцируются на высоком уровне. В первичной культуре клеток эпителия Е-кадгерин продуцируется на высоком уровне, а второй маркер – ЦК 8 продуцируется не всеми клетками культуры. Мезенхимные маркеры A549 продуцируют на низком уровне, при чём N-кадгерин выявляется не во всех клетках; HeLa характеризуются наиболее высоким уровнем продукции мезенхимных маркеров среди контрольных линий эпителиального происхождения, в них выявляется мембранная форма N-кадгерина; MCF7 характеризуются продукцией N-кадгерина на довольно низком уровне и отсутствием продукции виментина; в клетках первичной культуры эпителиальных клеток ПЖ мезенхимные маркеры не синтезируются.

Регуляторные маркеры синтезируются во всех исследованных клетках. В клетках всех контрольных эпителиальных линий выявляется цитоплазматический β -катенин, высокий уровень его продукции характерен для клеток линии HeLa. Ассоциированный с межклеточными контактами β -катенин выявляется в A549, MCF7 и в клетках первичной культуры эпителия ПЖ, однако такая форма β -катенина наблюдается не во всех клетках данных линий и характеризуется разным уровнем продукции; в большом количестве ассоциированная с межклеточными контактами форма β -катенина содержится в MCF7 и в

небольшом – в A549 и клетках первичной культуры эпителиальных клеток ПЖ. Slug продуцируется клетками всех контрольных клеточных линий эпителиального происхождения, при чём данный ТФ выявляется как в цитоплазме, так и в ядре. Для клеток линии A549 характерен низкий уровень синтеза Slug, который выявляется преимущественно в цитоплазме и в небольшом количестве – в ядре. По сравнению с остальными клеточными линиями, HeLa синтезирует Slug на более высоком уровне, однако ТФ выявляется исключительно в цитоплазме. MCF7 и клетки первичной культуры эпителия ПЖ синтезируют Slug на сходном уровне, причём локализация ТФ преимущественно цитоплазматическая, в ядре Slug содержится в небольшом количестве.

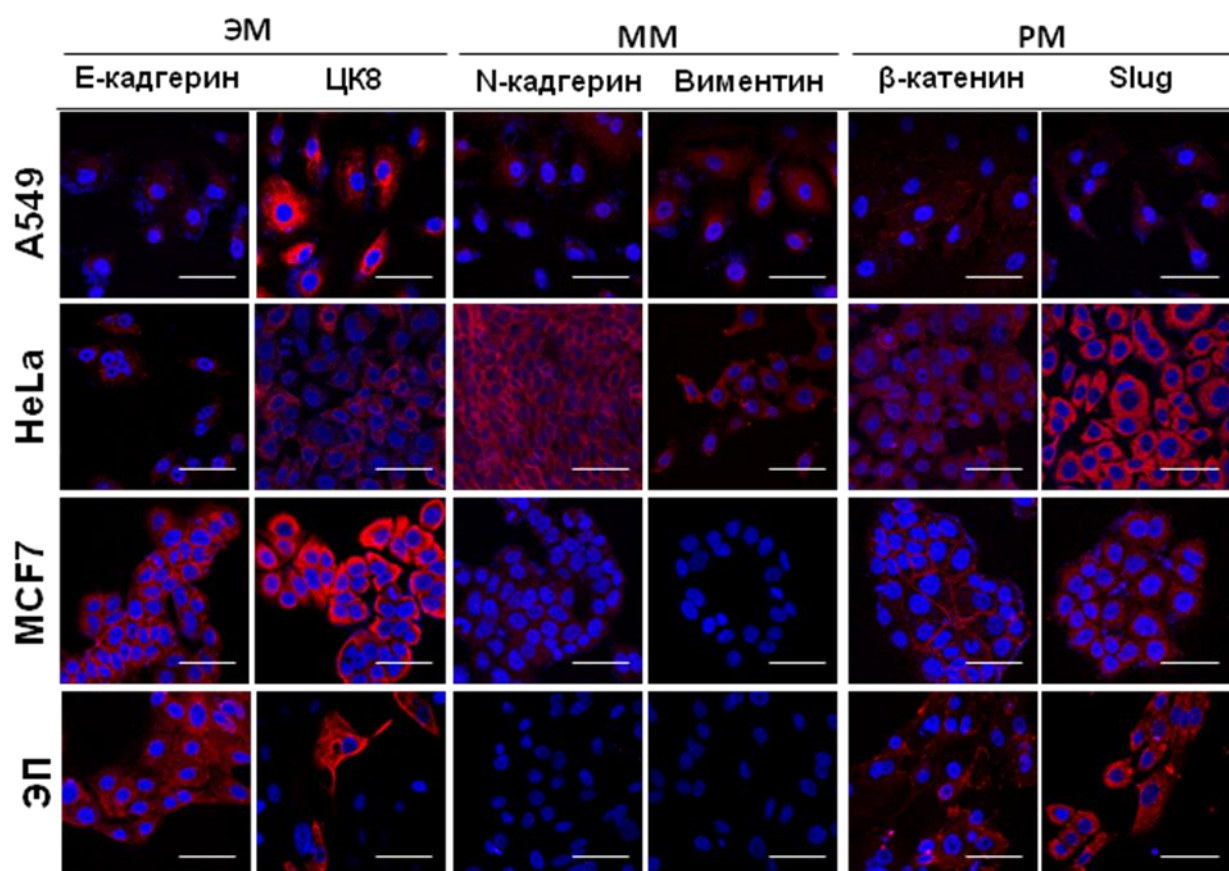


Рисунок 2. Продукция маркеров контрольными клеточными линиями эпителиального происхождения. Изображения получены на конфокальном микроскопе Leica с помощью лазеров с длиной волны 405, 543 и 633 нм, увеличение объектива 40х. Масштабная линейка соответствует 60 мкм.

3.3. Продукция мезенхимных маркеров на 2-ом и 7-ом пассажах в стромальных клетках ПЖ

В работе исследовались первичные культуры стромальных клеток, полученные из

нормальной и опухолевой ткани ПЖ четырёх пациентов № 15, 20, 23 и 27. Для удобства в дальнейшем они называются опытами 1, 2, 3, 4 соответственно. Уровень синтеза мезенхимных маркеров и его изменения в ходе культивирования различны как между клетками, полученными из нормальной и опухолевой ткани ПЖ, так и между клетками на раннем и позднем пассаже (Рисунок 3).

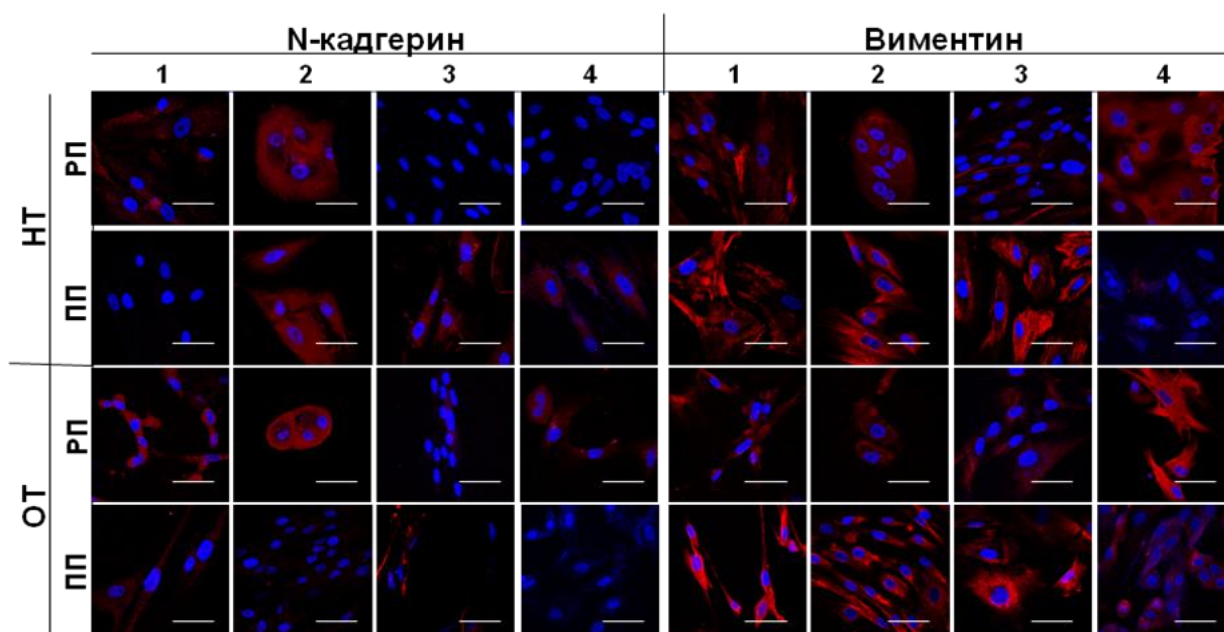


Рисунок 3. Продукция мезенхимных маркеров стромальными клетками в первичных культурах, полученных из нормальной и опухолевой ткани предстательной железы четырёх пациентов. Изображения получены на конфокальном микроскопе Leica с помощью лазеров с длиной волны 405, 543 и 633 нм, увеличение объектива 40х. Здесь и далее: НТ – нормальная ткань; ОТ – опухолевая ткань. Масштабная линейка соответствует 60 мкм.

Характер и уровень синтеза N-кадгерина неодинаков в стромальных клетках, однако есть и сходство – мембранная форма N-кадгерина не выявляется во всех исследованных клетках. В опыте № 1 клетки, полученные из нормальной ткани продуцируют N-кадгерин, имеющий цитоплазматическую локализацию, его продукция в ходе пассирования уменьшается до полного исчезновения. В том же опыте клетки, полученные из опухолевой ткани на 2 пассаже продуцируют маркер на более высоком уровне, снижающемся в ходе пассирования. В опыте № 2 в клетках, полученных из НТ, уровень синтеза N-кадгерина в ходе пассирования не изменяется, оставаясь на среднем уровне, в то же время клетки, полученные из ОТ на раннем пассаже демонстрируют сходный уровень синтеза, снижающийся практически до полного исчезновения в клетках

позднего пассажа. В опытах № 3 и 4 клетки, полученные из НТ, на 2 пассаже не продуцируют N-кадгерин, а в ходе пассирования наблюдается увеличение уровня продукции маркера. В то же время, в тех же опытах клетки, полученные из ОТ, не проявляют сходства в характере синтеза N-кадгерина ни друг с другом, ни с клетками, полученными из НТ. В опыте № 3 клетки, полученные из ОТ, на 2 пассаже характеризуются фактически отсутствием синтеза белка, с появлением синтеза белка в ходе пассирования. В опыте № 4 клетки, полученные из ОТ продуцируют небольшое количество N-кадгерина на 2 пассаже, полностью прекращая продукцию данного белка к 7 пассажу.

Виментин выявляется во всех исследованных клетках. В целом, для стромальных клеток характерен высокий уровень синтеза виментина, не различающийся между клетками, полученными из НТ и ОТ в ходе пассирования. Так как виментин является белком промежуточных филаментов, предполагалось обнаружить соответствующий рисунок синтеза белка, однако фибриллы виментина наблюдаются лишь в некоторых случаях. В опыте № 1 клетки, полученные из НТ, продуцируют виментин на среднем уровне как на раннем, так и на позднем пассаже, причём на 7 пассаже фибриллярная форма виментина выявляется более чётко. В том же опыте клетки, полученные из ОТ, продуцируют виментин на среднем уровне на 2 пассаже, однако уровень продукции увеличивается в клетках 8 пассажа. В опыте № 2 клетки, полученные из НТ, синтезируют среднее количество виментина, уровень его синтеза не изменяется в ходе пассирования, однако более чётко выявляются фибриллы, образуемые белком. Клетки того же опыта, полученные из ОТ, продуцируют сходный с клетками из НТ уровень виментина, заметно не изменяющийся в ходе пассирования, в то же время на 7 пассаже в некоторых клетках выявляется фибриллярная форма белка. В отличие от опытов № 1 и 2, где уровень синтеза виментина клетками мало изменялся в ходе пассирования, опыты № 3 и 4 значительно отличаются по характеру и уровню синтеза виментина клетками, изменяющемуся в ходе пассирования. В опыте № 3 клетки, полученные из НТ, продуцируют небольшое количество белка, увеличивающееся к 7 пассажу, при чём в клетках 7 пассажа более явно, по сравнению с клетками 2 пассажа, выявляются фибриллы, образованные виментином. Тенденция к увеличению уровня синтеза виментина прослеживается и в клетках, полученных из ОТ, однако в клетках 7 пассажа не выявляется фибриллярная форма виментина, которая выявляется на том же пассаже в клетках, полученных из НТ. В опыте № 4 в клетках, полученных из НТ, уровень синтеза виментина на раннем пассаже средний, фибриллярный рисунок не выявляется, а в ходе пассирования происходит прекращение

синтеза белка. В то же время, в том же опыте клетки, полученные из ОТ, на 2 пассаже демонстрируют высокий уровень синтеза виментина, фибриллы которого выявляются на изображении, снижающийся в ходе пассирования. Только в опыт № 4 для клеток, полученных из НТ и ОТ, характерен низкий, в сравнении с другими опытами, уровень синтеза виментина или даже его отсутствие на 7 пассаже.

В целом, в отличие от клеток контроля мезенхимного происхождения, некоторые стромальные клетки продуцируют N-кадгерин, хотя в некоторых опытах (опыт №1: клетки из НТ, ПП; опыт №2: клетки из ОТ, ПП; опыты № 3 и 4: клетки из НТ, РП; опыт №4: клетки из ОТ, ПП) не наблюдается синтеза данного маркера, как и в контрольных клетках. Виментин обнаружен во всех исследованных стромальных клетках, как и в контрольных клетках, однако фибриллярный рисунок выявляется лишь в некоторых стромальных клетках, а в ходе пассирования, в отличие от контрольных СКЭ, может происходить увеличение или уменьшение уровня продукции виментина. При сравнении с клетками контроля эпителиального происхождения выявляется отличие в локализации N-кадгерина: так, в клетках линии HeLa этот белок локализован в мембране, однако, ни в одном из опытов мембранное окрашивание не наблюдается.

3.4. Продукция эпителиальных маркеров на 2-ом и 7-ом пассажах в стромальных клетках ПЖ

Эпителиальные маркеры продуцируются стромальными клетками, полученными из НТ и ОТ, по-разному (Рисунок 4). В опытах № 1, 2 и 3 стромальные клетки, полученные из НТ, продуцируют E-кадгерин в небольшом количестве, маркер локализован в цитоплазме, уровень его продукции в ходе пассирования не изменяется. В опыте №4 клетки, полученные из НТ, не продуцируют E-кадгерин на раннем пассаже, однако на позднем пассаже наблюдается продукция данного маркера. В опыте №1 клетки, полученные из ОТ, характеризуются повышением уровня синтеза E-кадгерина в ходе пассирования, в опыте №2 клетки из ОТ продуцируют белок на высоком уровне, не изменяющемся в ходе пассирования. В опыте №3 в клетках из ОТ выявляется низкий уровень синтеза E-кадгерина, не изменяющийся в ходе пассирования. В опыте №4 клетки, полученные из ОТ, не продуцируют E-кадгерин на раннем пассаже, однако на позднем пассаже белок выявляется.

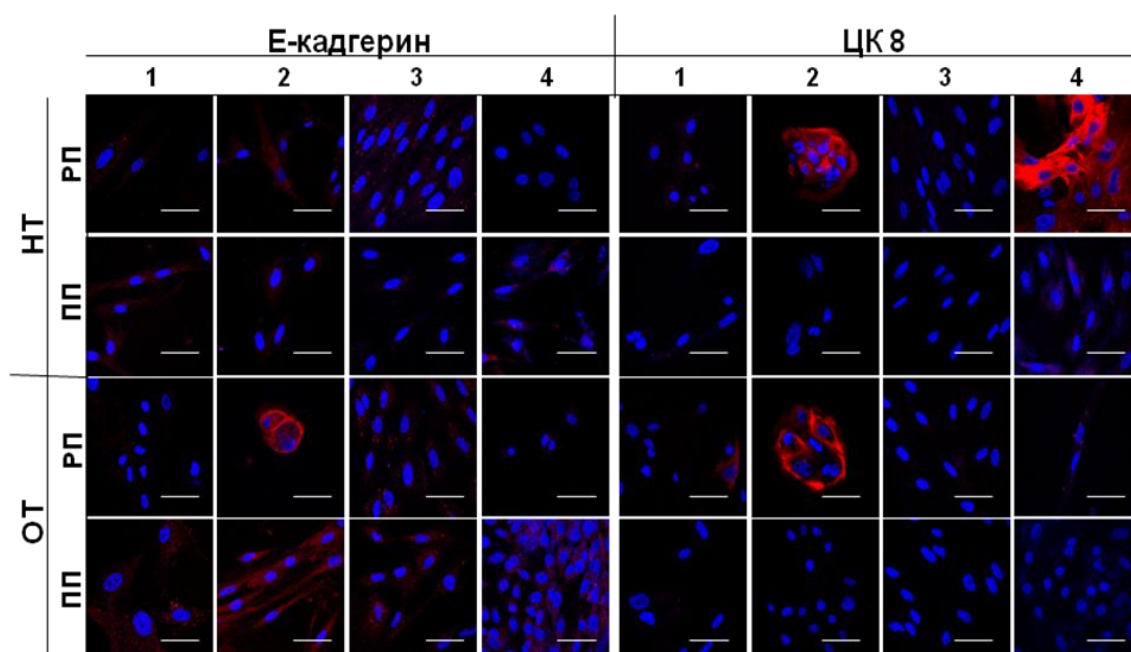


Рисунок 4. Продукция мезенхимных маркеров стромальными клетками в первичных культурах, полученных из нормальной и опухолевой ткани предстательной железы четырёх пациентов. Изображения получены на конфокальном микроскопе Leica с помощью лазеров с длиной волны 405, 543 и 633 нм, увеличение объектива 40х. Масштабная линейка соответствует 60 мкм.

В целом, по сравнению с клетками, полученными из НТ, для клеток из ОТ характерен более высокий уровень продукции Е-кадгерина на позднем пассаже. В опыте №1 клетки, полученные из НТ, практически не продуцируют ЦК8, на позднем пассаже продукция белка прекращается. В том же опыте в клетках, полученных из ОТ, продукция ЦК8 выявляется лишь в отдельных клетках на раннем пассаже, на позднем пассаже продукция также прекращается. В опыте № 2 клетки, полученные из НТ и ОТ, проявляют сходство: на раннем пассаже для них характерен высокий уровень синтеза ЦК8, а на позднем – полное исчезновение синтеза данного белка. В опыте № 3 клетки, полученные как из НТ, так и из ОТ, не продуцируют ЦК8 ни на раннем, ни на позднем пассаже. В опыте № 4 в клетках, полученных из НТ, выявляется высокий уровень синтеза ЦК8 на раннем пассаже, снижающийся в ходе пассирования. В том же опыте клетки, полученные из ОТ, характеризуются низким уровнем синтеза маркера на раннем пассаже и полным исчезновением синтеза на позднем пассаже.

Сравнение с клетками контроля эпителиального происхождения не просто, так как и в контроле, и в опытах наблюдается разнообразие в уровне продукции маркеров. Для некоторых клеток (опыты № 2 и 4) характерен высокий уровень синтеза ЦК8 и низкий уровень или даже отсутствие синтеза Е-кадгерина, что похоже на А549. Однако,

продукция ЦК8 ограничена ранними пассажами. Уровень экспрессии Е-кадгерина в стромальных клетках, полученных из НТ, достаточно низкий, может отсутствовать на РП, однако полностью на ПП не исчезает, в отличие от ЦК8. В клетках контроля эпителиальные маркеры продуцируются на высоком уровне (МСF7, первичная культура клеток эпителия ПЖ) на фоне отсутствия или низкого уровня экспрессии мезенхимных маркеров, в то же время, для стромальных клеток продукция эпителиальных маркеров является скорее исключением, чем правилом.

3.5. Продукция регуляторных маркеров на 2-ом и 7-ом пассажах в стромальных клетках ПЖ

Уровень продукции, локализация регуляторных белков, их выраженность на раннем и позднем пассаже неодинаковы (Рисунок 5). В опыте № 1 в клетках, полученных из НТ, на раннем пассаже β -катенин выявляется в небольшом количестве и имеет цитоплазматическую локализацию, уровень продукции повышается в ходе пассирования, в небольшом количестве в клетках 7 пассажа выявляется ядерная форма β -катенина. В том же опыте в клетках, полученных из ОТ, уровень синтеза β -катенина не изменяется в ходе пассирования, оставаясь средним, белок выявляется преимущественно в цитоплазме, а на позднем пассаже также в ядре. В опыте № 2 в клетках, полученных из НТ, выявляется β -катенин, предположительно связанный с межклеточными контактами, и выявляется небольшое количество белка в ядре, причём в ходе пассирования уровень продукции белка резко снижается, и белок выявляется в цитоплазме, но не в ядре. В том же опыте клетки, полученные из ОТ, характеризуются высоким уровнем продукции цитоплазматического β -катенина, уровень которого снижается в ходе пассирования, однако увеличивается уровень продукции ядерного β -катенина. В опыте № 3 в клетках, полученных из НТ, изменения уровня продукции маркера в ходе пассирования не обнаруживается, выявляется преимущественно цитоплазматическая форма белка, а в ядре его содержание низкое. В том же опыте в клетках, полученных из ОТ, β -катенин выявляется на раннем пассаже как в цитоплазме, так и в ядре, при чём уровень продукции белка, так же обнаруживаемого в двух компартментах клетки, возрастает на позднем пассаже. В опыте № 4 в клетках, полученных из НТ, уровень синтеза β -катенина не изменяется в ходе пассирования культуры, оставаясь довольно низким. В том же опыте клетки, полученные из ОТ, характеризуются более высоким уровнем синтеза маркера. В клетках 2 пассажа помимо цитоплазматической выявляется также ядерная форма белка, не

выявляемая в клетках той же культуры на 7 пассаже.

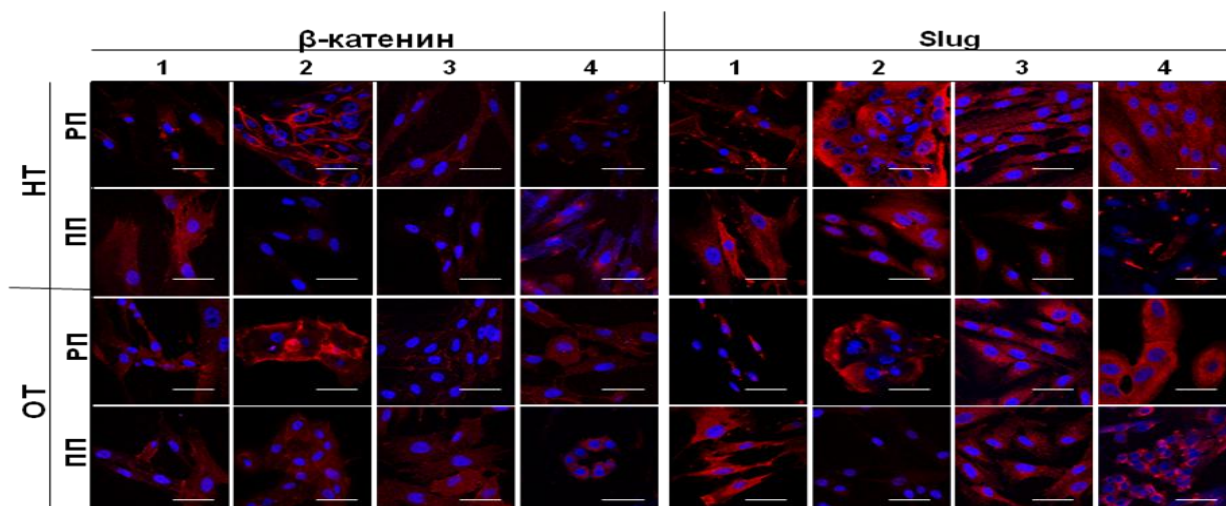


Рисунок 5. Продукция регуляторных маркеров стромальными клетками в первичных культурах, полученных из нормальной и опухолевой ткани предстательной железы четырёх пациентов. Изображения получены на конфокальном микроскопе Leica с помощью лазеров с длиной волны 405, 543 и 633 нм, увеличение объектива 40х. Масштабная линейка соответствует 60 мкм.

Slug выявляется во всех исследованных клетках, различаясь по уровню продукции и локализации между клетками, полученными из НТ и ОТ и находящимися на разных пассажах. В опыте № 1 в клетках, полученных из НТ, на раннем пассаже выявляется цитоплазматическая форма Slug, уровень продукции которой увеличивается в ходе пассирования, в то же время, в клетках 7 пассажа выявляется ядерная форма Slug, не наблюдаемая в клетках 2 пассажа. В том же опыте в клетках, полученных из ОТ, на раннем и позднем пассаже выявляется сходное количество ядерного Slug, однако происходит увеличение уровня продукции цитоплазматической формы. В опыте № 2 в клетках, полученных из НТ, наблюдается высокий уровень синтеза Slug, локализованного в цитоплазме, небольшое количество белка находится в ядре. В ходе пассирования в клетках снижается уровень цитоплазматического Slug и повышается уровень ядерной формы. В том же опыте клетки, полученные из ОТ, также характеризуются высоким уровнем синтеза Slug, выявляемого в цитоплазме, снижающемся в ходе пассирования. Однако, в клетках 2 пассажа отсутствует ядерная форма Slug, которая наблюдается в небольшом количестве в клетках 7 пассажа. В опыте № 3 клетки, полученные как из НТ, так и из ОТ, характеризуются высоким уровнем продукции локализующимся в цитоплазме Slug, не изменяющемся в ходе пассирования. В то же время, во всех исследованных в опыте № 3 клетках в небольшом количестве выявляется ядерная форма Slug. В опыте № 4

в клетках, полученных из НТ, Slug продуцируется на высоком уровне, имея преимущественно цитоплазматическую локализацию и выявляясь в небольшом количестве в ядре. В ходе пассирования клеток из НТ уровень синтеза цитоплазматического Slug резко снижается, ядерная форма не выявляется. В опыте № 4 в клетках, полученных из ОТ, так же, как и в клетках из НТ, наблюдается высокий уровень синтеза Slug на раннем пассаже, уменьшающийся в ходе пассирования. Ядерная форма Slug, выявляемая в клетках 2 пассажа, не наблюдается в клетках 7 пассажа.

Как и в клетках контроля эпителиального и мезенхимного происхождения, все стромальные клетки синтезируют регуляторные маркеры, при чём локализация обоих маркеров преимущественно цитоплазматическая, в некоторых клетках может наблюдаться ядерная форма β -катенина или Slug, однако уровень продукции ядерных форм белков остаётся очень низким.

Полученные результаты представлены в сводной таблице (Таблица 2).

Таблица 2. Сводная таблица результатов. «+» – наличие синтеза; «-» – отсутствие синтеза; «+-» – синтез на очень низком уровне.

Маркер/ клетки	N-кадгерин	Виментин	E-кадгерин	ЦК8	β -катенин в цитоплазме	β -катенин в ядре	Slug в цитоплазме	Slug в ядре
1 НТ РП	+	+	+-	+-	+	-	+	-
1 НТ ПП	-	+	+	-	+	+-	+	+-
1 ОТ РП	+	+	-	+-	+	-	+	+
1 ОТ ПП	+	+	+	-	+	+	+	+
2 НТ РП	+	+-	+-	+	+	+-	+	+
2 НТ ПП	+	+-	+-	-	+	-	+	+
2 ОТ РП	+	+	+	+	+	+-	+	-
2 ОТ ПП	+-	+	+	-	+	+-	+	+
3 НТ РП	-	+-	+	-	+	+-	+	+
3 НТ ПП	+	+	-	-	+	+-	+	+
3 ОТ РП	-	+	+	+-	+	+-	+	+-
3 ОТ ПП	+	-	+	-	+	+	+	+-
4 НТ РП	+	+	-	+	+	-	+	+-
4 НТ ПП	-	+	+-	+-	+	-	+	-

4 ОТ РП	+	+	-	+-	+	+-	+	+-
4 ОТ ПП	-	+	+	-	+	-	+	-

3.6. Маркерный профиль стромального компартмента нормальной и опухолевой ткани ПЖ по данным иммуногистохимии

В данной работе также использовался метод иммуногистохимической окраски срезов ткани ПЖ. Срезы нормальной и опухолевой ткани пациента № 20 (соответствует опыту № 2) были окрашены антителами к N-кадгерину, виментину и панцитокератину.

При окрашивании среза нормальной ткани антителами к N-кадгерину (Рисунок 6) наблюдается низкий уровень синтеза белка в стромальных клетках, отсутствие синтеза белка в эпителиальных клетках. N-кадгерин выявляется преимущественно в клетках эндотелия. На срезах опухолевой ткани наблюдается более низкий уровень продукции N-кадгерина, причём в эндотелии белок перестаёт выявляться на том же уровне, что в нормальной ткани. В то же время, в опухолевой ткани N-кадгерин выявляется в мембране некоторых эпителиальных клеток. Стоит отметить, что при помощи метода иммунофлуоресценции были получены отличающиеся результаты: высокий уровень продукции N-кадгерина в клетках, полученных как из нормальной, так и из опухолевой ткани.

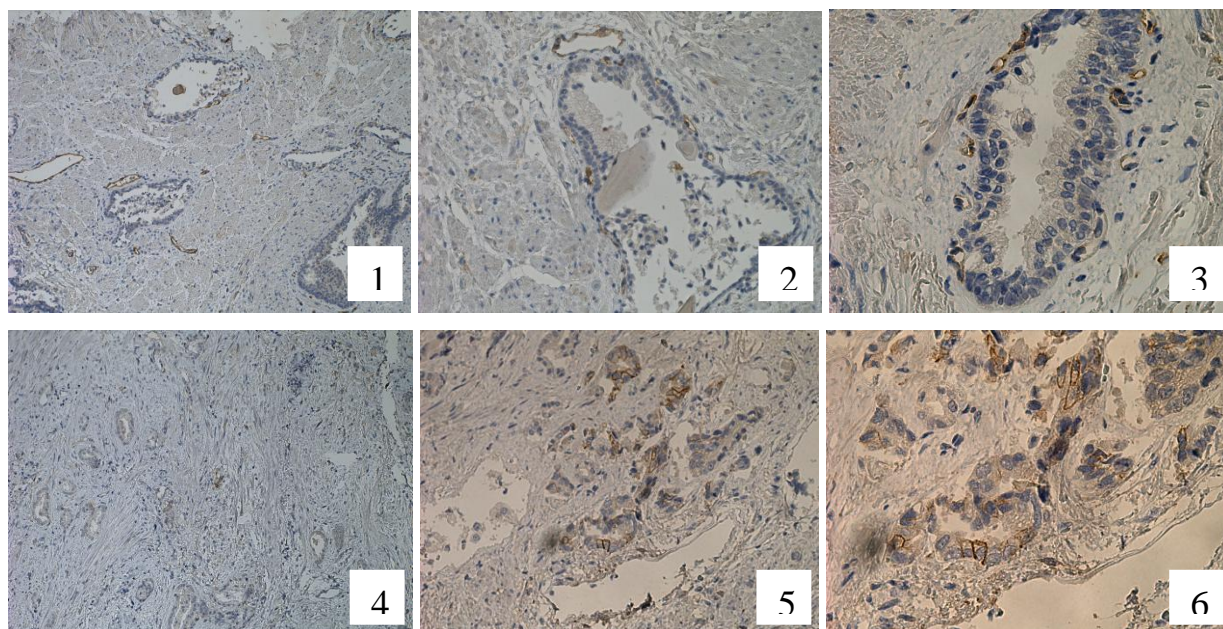


Рисунок 6. Иммуногистохимическая окраска нормальной и опухолевой ткани ПЖ пациента № 20 антителами к N-кадгерину. 1, 2, 3 – нормальная ткань, 4, 5, 6 – опухолевая ткань. 1, 4 – увеличение объектива x10; 2, 5 – увеличение объектива x20; 3, 6 – увеличение объектива x40.

Иммуногистохимический анализ срезов нормальной ткани ПЖ на виментин (Рисунок 7) показал достаточно низкий уровень экспрессии белка в клетках стромы, однако, в отличие от N-кадгерина, виментин выявляется как в клетках эндотелия, так и в других стромальных клетках, окружающих эпителий. В целом, уровень синтеза виментина стромальными клетками оказывается выше, чем уровень синтеза N-кадгерина. В то же время, виментин также может обнаруживаться в клетках эпителия. Опухолевая ткань резко отличается по строению от нормальной: при развитии рака образуются многочисленные новообразования, состоящие из одного слоя эпителиальных клеток. На срезах опухолевой ткани можно наблюдать более высокий уровень синтеза виментина стромальными клетками в сравнении с нормальной тканью. Виментин может выявляться в эпителиальных клетках, но его уровень продукции ниже, чем в эпителиальных клетках нормальной ткани.

Анализ клеток, полученных из образца ткани того же пациента, методом иммунофлуоресценции показал высокий уровень продукции виментина в клетках, полученных из НТ и ОТ. Возможно, это связано с тем, что основная масса стромальных клеток представлена ГМК, которые в первичной культуре клеток, полученной из стромы ПЖ, быстро становятся фибробластоподобными (Hayward et al., 1997).

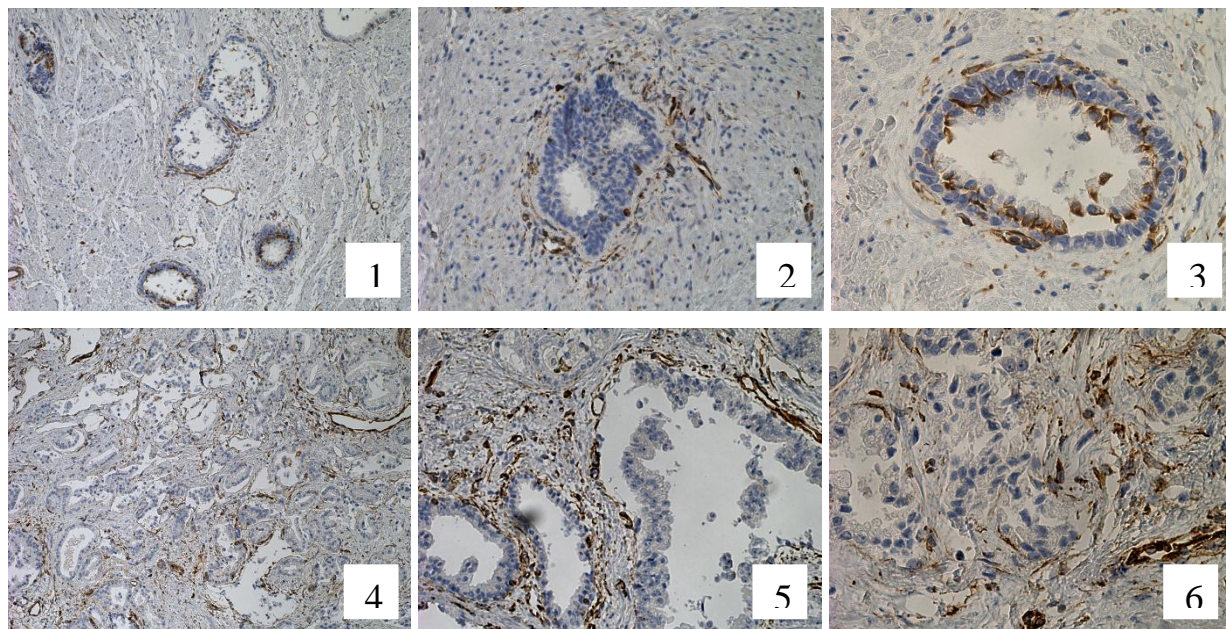


Рисунок 7. Иммуногистохимическая окраска нормальной и опухолевой ткани ПЖ пациента № 20 антителами к виментину. 1, 2, 3 – нормальная ткань, 4, 5, 6 – опухолевая ткань. 1, 4 – увеличение объектива x10; 2, 5 – увеличение объектива x20; 3, 6 – увеличение объектива x40.

Срезы нормальной и опухолевой ткани ПЖ также окрашивались антителами к панцитокератину, не использовавшимися в иммунофлуоресцентном анализе. Такое окрашивание (Рисунок 8) позволило визуализировать изменения, происходящие в ткани ПЖ в ходе развития рака. Антитела к панцитокератину выявляют целый набор кератинов (4, 5, 6, 8, 10, 13, 18), позволяя выявить эпителиальные клетки в ткани ПЖ. Стромальные клетки не продуцируют данные белки ни в нормальной, ни в опухолевой ткани. На срезах опухолевой ткани детектируются многочисленные новообразования эпителиального происхождения, уровень синтеза цитокератинов в них оказывается ниже, чем в эпителиальных клетках нормальной ткани.

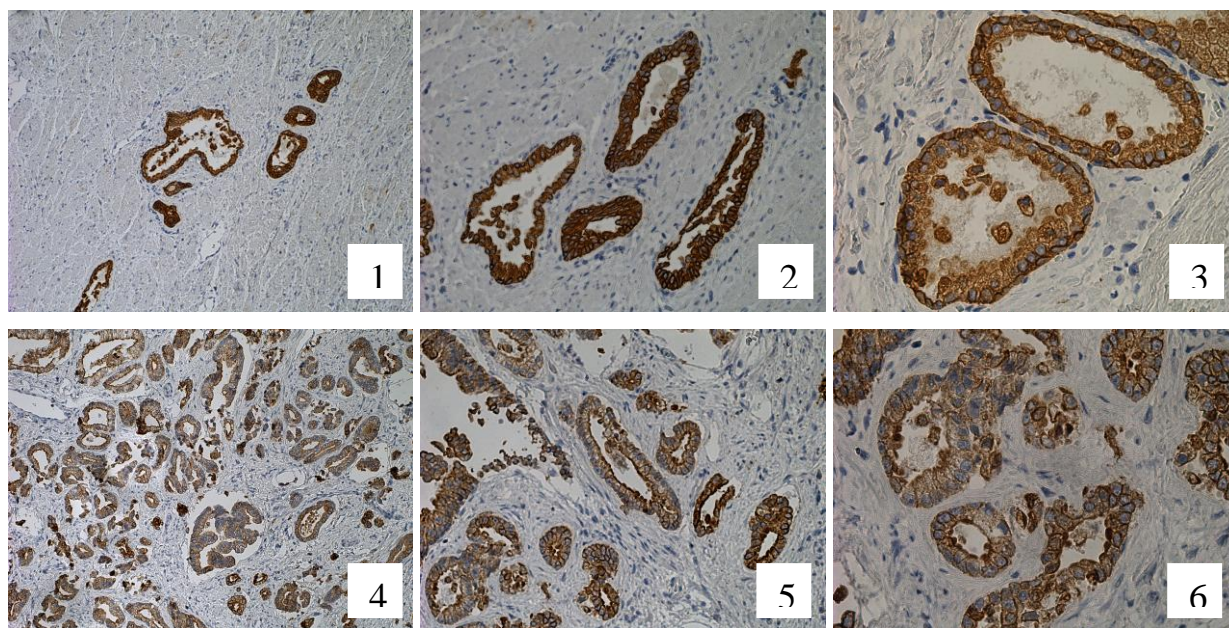


Рисунок 8. Иммуногистохимическая окраска нормальной и опухолевой ткани ПЖ пациента № 20 антителами к панцитокератину. 1, 2, 3 – нормальная ткань, 4, 5, 6 – опухолевая ткань. 1, 4 – увеличение объектива x10; 2, 5 – увеличение объектива x20; 3, 6 – увеличение объектива x40.

Глава 4. Обсуждение

Механизмы и причины развития рака ПЖ на сегодняшний день не понятны до конца. Определённую роль в развитии заболевания играет микроокружение опухоли, представленное стромальными клетками. Известно, что строма, окружающая опухоль, изменена и отличается от нормальной, однако работ, описывающих фенотип таких изменённых клеток, по-прежнему недостаточно.

В данном исследовании была предпринята попытка описать характер экспрессии некоторых маркеров в первичных культурах стромальных клеток, полученных из нормальной и опухолевой ткани ПЖ. В результате проделанных опытов показана возможность получения и культивирования стромальных клеток в первичных культурах. С использованием полученных культур была охарактеризована продукция мезенхимных, эпителиальных и регуляторных маркеров в стромальных клетках из НТ и ОТ и её изменения в ходе пассирования культур. Стромальные клетки демонстрируют различный характер продукции выбранных маркеров, что может служить следствием наличия функционально и фенотипически различных клеток в строме ПЖ. Стоит отметить, что характер экспрессии маркеров зависит от ряда обстоятельств: так, количество клеток в культуре, синтезирующих маркеры ГМК, зависит от условий культивирования, числа пассажей и возраста пациентов (Peehl & Sellers, 2000).

Предполагалось, что стромальные клетки не продуцируют эпителиальные маркеры, однако, как показывают проведённые опыты, некоторые стромальные клетки могут продуцировать как Е-кадгерин, так и ЦК8. Однако, так как ЦК8 выявляется не во всех клетках раннего пассажа и не выявляется в клетках позднего пассажа, можно предположить, что либо синтез этого маркера не характерен для стромальных клеток, либо характерен для некоторых клеток стромы, но данный признак теряется в ходе культивирования. В исследовании Sherwood с использованием метода двумерного гелевого электрофореза показано отсутствие экспрессии гена ЦК8 в стромальных клетках из первичных культур, что противоречит результатам, полученным в данной работе, и требует дальнейшего исследования (Sherwood et al., 1989). Мало характерен для стромальных клеток и синтез Е-кадгерина. Хотя в клетках из НТ его продукция сохраняется в ходе культивирования, синтез поддерживается на крайне низком уровне. В то же время, если характер продукции ЦК8 схож у клеток из НТ и ОТ, в клетках из ОТ уровень синтеза Е-кадгерина на позднем пассаже оказывается выше, чем в клетках, полученных из НТ.

Ввиду недостаточности имеющихся данных, нельзя сделать однозначный вывод о типичности синтеза данных эпителиальных маркеров стромальными клетками. В то же время имеющиеся результаты свидетельствуют о более высоком уровне синтеза Е-кадгерина в клетках из НТ, что проявляется в ходе их культивирования, и характерном для клеток из НТ и ОТ низком уровне синтеза ЦК8 или даже его отсутствии.

Мезенхимные маркеры синтезируются большинством клеток, что отличает их, например, от эпителиальных маркеров. N-кадгерин в данной работе рассматривается как мезенхимный маркер, хотя он синтезируется и в эпителиальных клетках. Из 4 опытов только в 2 клетки, полученные из НТ, продуцируют N-кадгерин на раннем пассаже, причём изменения характера синтеза маркера в ходе культивирования неодинаковы: в одном опыте уровень продукции не изменяется, в двух – маркер начинает синтезироваться, а ещё в одном, наоборот, перестаёт. Клетки, полученные из ОТ, характеризуются наличием синтеза N-кадгерина на раннем пассаже во всех опытах, хотя исключением можно считать клетки в опыте № 3. Клетки в том же опыте на позднем пассаже демонстрируют небольшое увеличение уровня синтеза белка, в других опытах прослеживается, наоборот, снижение уровня продукции.

В исследованиях, посвященных эпителиальным клеткам ПЖ, показано увеличение уровня продукции N-кадгерина при развитии рака ПЖ, что коррелирует с тяжестью заболевания. В работе Tran показано образование контактов с помощью N-кадгерина между фибробластами стромы ПЖ и эпителиальными клетками, полученными из опухолевой ткани ПЖ (Tran et al., 1999). В указанной работе также выявлялся высокий уровень продукции N-кадгерина стромальными клетками на срезах ткани ПЖ человека, вследствие чего авторами было высказано предположение о корреляции между высоким уровнем синтеза N-кадгерина и инвазией раковых клеток при отсутствии продукции данного белка в нетрансформированных эпителиальных клетках. Возможно, отсутствие мембранного N-кадгерина в проведённых опытах связано с перераспределением белка, происходящем вследствие нарушения структуры ткани и контактов, которые прежде связывали стромальные клетки с эпителиальными.

Другой мезенхимный маркер – виментин – обнаруживается во всех исследованных клетках, причём между клетками из НТ и ОТ прослеживается схожесть в продукции маркера. Так, в опытах, дающих схожие результаты, клетки, полученные из НТ и ОТ, продуцируют виментин на высоком уровне, практически не изменяющемся в ходе пассирования. В опыте № 3 в ходе культивирования происходит повышение уровня синтеза виментина в клетках, а в опыте № 4, наоборот, снижение. В работе Tuxhorn

показано увеличение уровня синтеза виментина в стромальных клетках при раке ПЖ, причём данный белок выявлялся во всех исследуемых клетках (Tuxhorn et al., 2002). В то же время уровень синтеза виментина стромальными клетками нормальной ткани ПЖ оставался низким, повышаясь в клетках, находящихся в непосредственной близости от очага опухолеобразования. В отличие от результатов указанного исследования, в данной работе повышения уровня синтеза виментина в стромальных клетках, полученных из ОТ ПЖ, не наблюдается.

Неоднозначность результатов характерна не только для стромальных, но и для эпителиальных клеток. Так, в работе Heatley значимого изменения уровня продукции виментина в эпителии при развитии рака ПЖ не показано (Heatley et al., 1995). В то же время существуют исследования, показывающие повышение уровня синтеза виментина в эпителиальных клетках при раке (Micalizzi et al., 2010). В продолжении данной работы планируется сравнивать характер продукции маркеров между стромальными и эпителиальными клетками, чтобы выявить их взаимосвязь и общий характер синтеза белков в двух компартментах ПЖ.

В целом, для клеток из НТ и ОТ характерен синтез виментина как на 2, так и на 7 пассаже, без значительного изменения уровня его продукции в ходе пассирования, что может быть характерно, например, для эпителиальных клеток при развитии рака ПЖ, а также избирательная продукция N-кадгерина клетками 2 пассажа и более высоким уровнем продукции этого белка на 7 пассаже в клетках из НТ по сравнению с клетками из ОТ.

Регуляторные маркеры предсказуемо выявлялись во всех исследованных клетках. Однако, хотя β -катенин мог выявляться в трёх формах: цитоплазматической, мембранной и ядерной, практически во всех опытах он имел цитоплазматическую локализацию. В том случае, если выявлялась мембранная форма белка, предполагалось, что он находится в комплексе с E-кадгерином. Данное предположение не подтверждается, так как даже в клетках, продуцирующих одновременно E-кадгерин и мембранный β -катенин, E-кадгерин не имеет мембранной локализации, что не позволяет утверждать, что он находится во взаимодействии с β -катенином. Если для эпителиальных клеток при раке ПЖ характерно увеличение уровня ядерного β -катенина, то в стромальных клеток данное явление не прослеживается. Более того, для стромальных клеток в целом характерно отсутствие ядерной формы β -катенина, что свидетельствует о неактивном сигнальном пути Wnt/ β -катенин и деградации β -катенина в цитоплазме, что может объяснять преимущественную цитоплазматическую форму белка. Возможно, отличительной особенностью стромальных

клеток является высокий уровень цитоплазматического и низкий – мембранного β -катенина. Для стромальных клеток, полученных из НТ ПЖ, характерно как увеличение, так и снижение уровня продукции β -катенина в ходе пассирования, однако, уровень продукции белка этими клетками оказывается ниже, чем в клетках из ОТ.

Также для стромальных клеток нехарактерно наличие ядерной формы Slug, которая обнаруживается в эпителиальных клетках в ходе прохождения ЭМП при развитии рака ПЖ. Возможно, данный маркер выявляется в ядре в большем количестве при приобретении эпителиальными клетками свойства инвазивности. Преимущественная цитоплазматическая локализация Slug может быть объяснена его деградацией в условиях отсутствия активности сигнальных путей, индуцирующих функционирование Slug.

В данной работе был задействован метод иммуногистохимии для анализа срезов ткани одного из пациентов, клетки из которой исследовались методом иммунофлуоресценции. Два метода показали различия в результатах, что может быть обусловлено как особенностями данных методов, так и различным характером исследуемого материала. Метод иммуногистохимии может более точно отражать изменения, затрагивающие стромальные клетки при развитии рака ПЖ в сравнении с нормой, однако анализ этих изменений во времени осложнён, поэтому используются клеточные культуры, чьи свойства могут отличаться от свойств клеток ткани. В дальнейшей работе планируется использовать несколько методов, позволяющих более точно охарактеризовать синтез белков стромальными и эпителиальными клетками, в том числе метод иммуногистохимической окраски срезов ткани ПЖ.

Выводы

1. Были получены и криоконсервированы четыре первичных культуры стромальных клеток нормальной и опухолевой ткани предстательной железы пациентов, подвергнутых радикальной простатэктомии по поводу рака предстательной железы.
2. Стромальные клетки нормальной и опухолевой ткани продуцируют мезенхимные, эпителиальные и регуляторные маркеры. На 2 пассаже между клетками наблюдается больше сходства в продукции данных маркеров, чем на 7 пассаже.
3. В ходе культивирования стромальных клеток нормальной и опухолевой ткани предстательной железы выявлено сходство в изменении характера продукции одних маркеров (виментин, цитокератин 8, Slug) и разница в изменении характера продукции других маркеров (N-кадгерин, E-кадгерин, β -катенин).

Список литературы

1. Abate-Shen C., Shen M. Molecular genetics of prostate cancer // *Genes & Development*, 2000. P. 2410-2434.
2. Abrahamsson P.A. Neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma // *Prostate*, 1999. Vol. 39. P. 135–148.
3. Amir A.L., Barua M., McKnight N.C., Cheng S., Yuan X., and Balk S.P. A direct beta-catenin-independent interaction between androgen receptor and T cell factor 4 // *The Journal of biological chemistry*, 2003. Vol. 278.
4. Amorino G.P., Parsons S.J. Neuroendocrine cells in prostate cancer // *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr*, 2004. Vol.14. P. 287–300.
5. Andersson S., Berman D.M., Jenkins E.P., Russell D.W. Deletion of steroid 5 alpha-reductase 2 gene in male pseudohermaphroditism // *Nature*, 1991. Vol. 354. P.159–161.
6. Andrew, A., Kramer, B., and Rawdon, B.B. Gut and pancreatic amine precursor uptake and decarboxylation cells are not neural crest derivatives // *Gastroenterology*, 1983. Vol. 84. P. 429–431.
7. Aumuller G., Leonhardt M., Janssen M., Konrad L., Bjartell A., Abrahamsson P.A. Neurogenic origin of human prostate endocrine cells // *Urology*, 1999. Vol. 53. P. 1041–1048.
8. Bauer N., Fonseca A.V., Florek M., Freund D., Jászai J., Bornhäuser M., Fargeas C.A., Corbeil D. New insights into the cell biology of hematopoietic progenitors by studying prominin-1 (CD133) // *Cells Tissues Organs*, 2008. Vol.188. P. 127–138.
9. Bhatia-Gaur R., Donjacour A. A., Sciavolino P. J., Kim M., Desai N., Young P., Norton C. R., Gridley T., Cardiff R. D., Cunha G. R. et al. Roles for Nkx3.1 in prostate development and cancer // *Genes Dev.*, 1999. Vol. 13. P. 966-977.
10. Bickers B., Aukim-Hastie C. New molecular biomarkers for the prognosis and management of prostate cancer--the post PSA era // *Anticancer research*, 2009. Vol. 29, issue 8. P. 3289-98.

11. Bisson I., Prowse D. WNT signaling regulates self-renewal and differentiation of prostate cancer cells with stem cell characteristics // *Cell Research*, 2009. Vol. 19, issue 6. P. 683-697.
12. Bostwick D., Pacelli A. & Lopez-Beltran A. Molecular biology of prostatic intraepithelial neoplasia // *Prostate*, 1996. Vol. 29. P. 117–134.
13. Cano P., Godoy A., Escamilla R., Dhir R., Onate S. Stromal-epithelial cell interactions and androgen receptor-coregulator recruitment is altered in the tissue microenvironment of prostate cancer // *Cancer Research*, 2007. Vol. 67, issue 2. P. 511-519.
14. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases // *Nature*, 2000. Vol. 407. P. 249–257.
15. Chaffer C., Thompson E., Williams E. Mesenchymal to epithelial transition in development and disease // *Cells Tissues Organs*, 2007. Vol. 185, issue 1-3. P. 7-19.
16. Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease // *Cell*, 2006. Vol. 127. P. 469–480.
17. Corominas-Faja B., Cufí S., Oliveras-Ferreros C., Cuyàs E., López-Bonet E., Lupu, R., Alarcón T., Vellon L., Iglesias J.M., Leis O. et al. Nuclear reprogramming of luminal-like breast cancer cells generates Sox2-overexpressing cancer stem-like cellular states harboring transcriptional activation of the mTOR pathway // *Cell Cycle*, 2013. Vol. 12. P. 3109–3124.
18. Cunha G.R., Battle E., Young P., Brody J., Donjacour A., Hayashi N. and Kinbara H. Role of epithelial–mesenchymal interactions in the differentiation and spatial organization of visceral smooth muscle // *Epithelial Cell Biol*, 1992. Vol. 1. P. 76–83.
19. Cunha G.R., Donjacour A.A., Cooke P.S., Mee S., Bigsby R.M., Higgins S.J. and Sugimura Y. The endocrinology and developmental biology of the prostate // *Endocrine Rev*, 1987. Vol. 8. P. 338–362.
20. De Craene B, Berx G: Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression // *Nat Rev Cancer*, 2013. Vol.13. P. 97–110.
21. De Craene B., Berx G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression // *Nat Rev Cancer*, 2013. Vol. 13. P. 97–110.

22. De Marzo A., Meeker A., Epstein J. & Coffey D. Prostate stem cell compartments: expression of the cell cycle inhibitor p27Kip1 in normal, hyperplastic, and neoplastic cells // American Journal of Pathology, 1998. Vol. 153. P. 911–919.
23. De Wever O., Mareel M. Role of tissue stroma in cancer cell invasion // J Pathol, 2003. Vol. 200, issue 4. P. 429-44.
24. El-Alfy M., Pelletier G., Hermo L., Labrie F. Unique features of the basal cells of human prostate epithelium // Microscopy research and technique, 2000. Vol. 51, issue 5. P. 436-446.
25. Esposito S., Russo M., Airoidi I., Tupone M., Sorrentino C., Barbarito G., Meo S., Carlo E. SNAI2/Slug gene is silenced in prostate cancer and regulates neuroendocrine differentiation, metastasis-suppressor and pluripotency gene expression // Oncotarget, 2015. Vol. 6, issue 19. P. 17121-17134.
26. Francis J., Thomsen M., Taketo M., Swain A. β -Catenin Is Required for Prostate Development and Cooperates with Pten Loss to Drive Invasive Carcinoma // PLoS Genetics, 2013. Vol. 9, issue 1.
27. Goldstein A., Huang J., Guo C., Garraway I., Witte O. Identification of a cell of origin for human prostate cancer // Science, 2010. Vol. 329. P. 568–571.
28. Goldstein AS, Lawson DA, Cheng D, Sun W, Garraway IP, Witte ON. Trop2 identifies a subpopulation of murine and human prostate basal cells with stem cell characteristics. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008; 105:20882–20887.
29. Grant C., Kyprianou N. Epithelial mesenchymal transition (EMT) in prostate growth and tumor progression // Translational Andrology and Urology, 2013. Vol. 2, issue 4. P. 202-211.
30. Gravdal K., Halvorsen O., Haukaas S., Akslen L. A switch from E-cadherin to N-cadherin expression indicates epithelial to mesenchymal transition and is of strong and independent importance for the progress of prostate cancer // Clinical Cancer Research, 2007. Vol. 13, issue 23. P. 7003-7011.
31. Hägglöf C., Bergh A. The stroma-a key regulator in prostate function and malignancy // Cancers, 2012. Vol. 4, issue 2. P. 531-548.

32. Hayward S., Wang Y., Cao M., Hom Y., Zhang B., Grossfeld G., Sudilovsky D. and Cunha G. Malignant transformation in a non-tumorigenic human prostatic epithelial cell line // *Cancer Res*, 2001. Vol. 61. P. 8135–8142.
33. Hayward S.W., Baskin L.S., Haughney P.C., Foster B.A., Prins G.S., Dahiya R., Cunha G.R. Epithelial development in the rat ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle // *Acta Anat*, 1996. Vol. 155. P. 81–93.
34. Hayward S.W., Cunha G.R. and Dahiya R. Normal development and carcinogenesis of the prostate: A unifying hypothesis // *Ann NY Acad Sci*, 1996. Vol. 784. P. 50–62.
35. Hayward S., Rosen M., Cunha G. Stromal-epithelial interactions in the normal and neoplastic prostate // *British journal of urology*, 1997. Vol. 79. Suppl 2. P. 18-26.
36. Hayward S.W., Haughney P.C., Rosen M.A., Greulich K.M., Weier H.U., Dahiya R. and Cunha G.R. Interactions between adult human prostatic epithelium and rat urogenital sinus mesenchyme in a tissue recombination model // *Differentiation*, 1998. Vol. 63. P. 131–140.
37. Hazan RB, Kang L, Whooley BP, Borgen PI. N-cadherin promotes adhesion between invasive breast cancer cells and the stroma // *Cell Adhesion Commun*, 1997. Vol. 4. P. 399–411.
38. Heatley M., Maxwell P., Whiteside C., Toner P. Vimentin and cytokeratin expression in nodular hyperplasia and carcinoma of the prostate // *J Clin Pathol*, 1995. Vo. 48. P.1031-1034.
39. Isaacs J.T. and Coffey D.S. Etiology and disease process of benign prostatic hyperplasia // *Prostate Suppl*, 1989. Vol. 2. P. 33–50.
40. Jarred R.A., McPherson S.J., Bianco J.J., Couse J.F., Korach K.S., Risbridger G.P. Prostate phenotypes in estrogen-modulated transgenic mice // *Trends Endocrinol. Metab.*, 2002. Vol. 13. P. 163–168.
41. Jaworska D., Król W., Szliszka E. Prostate cancer stem cells: Research advances // *International Journal of Molecular Sciences*, 2015. Vol. 16, issue 11. P. 27433-27449.
42. Jiang W., Peng J., Zhang Y., Cho W.C., Jin K. The implications of cancer stem cells for cancer therapy // *Int. J. Mol. Sci.*, 2012. Vol. 13. P. 16636–16657.

43. Jin H., Varner J. Integrins: roles in cancer development and as treatment targets // *Br J Cancer*, 2004. Vol. 90. P. 561–5.
44. Johnson M., Rajamannan N. Diseases of Wnt signaling // *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 2006. Vol. 7, issue 1-2. P. 41-49
45. Kalluri R., Weinberg R. The basics of epithelial-mesenchymal transition // *Journal of Clinical Investigation*, 2009. Vol. 119, issue 6. P. 1420-1428.
46. Kharashvili G., Simkova D., Makharoblidze E., Trtkova K., Kolar Z., Bouchal J. Wnt signaling in prostate development and carcinogenesis // *Biomedical Papers*, 2011. Vol. 155, issue 1. P. 11-18.
47. Kim K., Kugler M., Wolters P., Robillard L., Galvez M., Brumwell A., Sheppard D., Chapman H. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix // *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006. Vol. 103, issue 35. P. 13180-13185.
48. Knudsen BS, Edlund M. Prostate cancer and the met hepatocyte growth factor receptor // *Adv Cancer Res*, 2004. Vol. 91. P. 31–67.
49. Korsten H., Ziel-van der Made A., Ma X., van der Kwast T., Trapman J. Accumulating progenitor cells in the luminal epithelial cell layer are candidate tumor initiating cells in a Pten knockout mouse prostate cancer model // *PLoS One*, 2009. Vol. 4. P. e5662.
50. Kypta R., Waxman J. Wnt/ β -catenin signalling in prostate cancer // *Nature Reviews Urology*, 2012. Vol. 9, issue 8. P. 418-428.
51. Lamouille S., Xu J., Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition // *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2014. Vol. 15, issue 3. 178-196.
52. Lawson D., Zong Y., Memarzadeh S., Xin L., Huang J., Witte O. Basal epithelial stem cells are efficient targets for prostate cancer initiation // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010. Vol. 107, issue 6. P. 2610-5.
53. Lee D.K., Liu Y., Liao L., Wang F., Xu J. The prostate basal cell (BC) heterogeneity and the p63-positive BC differentiation spectrum in mice // *Int J Biol Sci.*, 2014. Vol. 10. P. 1007–1017.

54. Lin V.K., Wang S.-Y., Vazquez D. V., Xu C. C., S. Zhang, and Tang L. Prostatic stromal cells derived from benign prostatic hyperplasia specimens possess stemcell like property // *Prostate*, 2007. Vol. 67, no. 12. P. 1265–1276.
55. Liu A., True L., LaTray L., Nelson P., Ellis W., Vessella R., Lange P., Hood L., van den Engh G. Cell-cell interaction in prostate gene regulation and cytodifferentiation // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997. Vol. 94, issue 20. P. 10705-10.
56. Liu J., Uygun B., Zhang Z., Shao L., Romero D., Vary C., Ding Q., Wu W. Slug Inhibits Proliferation of Human Prostate Cancer Cells via Downregulation of Cyclin D1 Expression // *Prostate*, 2010. Vol. 70, issue 16. P. 1768-1777.
57. Liu J., Uygun B., Zhang Z., Shao L., Romero D., Vary C., Ding Q., Wu W. Slug Inhibits Proliferation of Human Prostate Cancer Cells via Downregulation of Cyclin D1 Expression // *Prostate*, 2010. Vol. 70, issue 16. P. 1768-1777.
58. Maeda A, Nakashiro K, Hara S, Sasaki T, Miwa Y, et al. Inactivation of AR activates HGF/c-Met system in human prostatic carcinoma cells // *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. Vol. 347. P. 1158–65.
59. Mani S., Guo W., Liao M., Eaton E., Ayyanan A., Zhou A. et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells // *Cell*, 2008. Vol. 133(4). P. 704-15.
60. Mani S.A., Guo W., Liao M.J., Eaton E.N., Ayyanan A., Zhou A.Y., Brooks M., Reinhard F., Zhang C.C., Shipitsin M. et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells // *Cell*, 2008. Vol. 133. P. 704–715.
61. Marker P., Donjacour A., Dahiya R., Cunha G. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development // *Developmental Biology*, 2003. Vol. 253, issue 2. P. 165-174.
62. Matuszak E., Kyprianou N. Androgen regulation of epithelial–mesenchymal transition in prostate tumorigenesis // *Expert Review of Endocrinology & Metabolism*, 2011. Vol. 6, issue 3. P. 469-482.
63. McNeal J.E. Normal histology of the prostate // *Am. J. Surg. Pathol.*, 1988. Vol. 12. P. 619–633.

64. McNeal J.E. Origin and development of carcinoma in the prostate // *Cancer*, 1969. Vol. 23. P. 24–34.
65. McNeal J.E. Origin and evolution of benign prostatic enlargement // *Invest. Urol.*, 1978. Vol. 15. P. 340–345.
66. Micalizzi D., Farabaugh S., Ford H. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: Parallels between normal development and tumor progression // *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 2010. Vol. 15, issue 2. P. 117-134.
67. Min J., Zaslavsky A., Fedele G., McLaughlin S.K., Reczek E.E., De Raedt T., et al. An oncogene-tumor suppressor cascade drives metastatic prostate cancer by coordinately activating Ras and nuclear factor-kappaB // *Nat Med.*, 2010. Vol. 16. P. 286–294.
68. Niu Y., Xia S. Stroma–epithelium crosstalk in prostate cancer // *Asian Journal of Andrology*, 2009. Vol. 11, issue 1. P. 28-35.
69. Oosterhoff JK, Grootegoed JA, Blok LJ. Expression profiling of androgen-dependent and -independent LNCaP cells: EGF versus androgen signaling // *Endocr Relat Cancer*, 2005. Vol.12. P. 135–48.
70. Park S.M., Gaur A.B., Lengyel E., Peter M.E. The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2 // *Genes Dev.*, 2008. Vol. 22. P. 894–907.
71. Peehl D. Primary cell cultures as models of prostate cancer development // *Endocrine-Related Cancer*, 2005. Vol. 12, issue 1. P. 19-47.
72. Peehl D.M. and Sellers R.G. Cultured Stromal Cells: An In Vitro Model of Prostatic Mesenchymal Biology // *The Prostate*, 2000. Vol. 45. P.115–123.
73. Prins G.S., Cooke P.S., Birch L., Donjacour A.A., Yalcinkaya T.M., Siiteri P.K., Cunha G.R. Androgen receptor expression and 5 α -reductase activity along the proximal-distal axis of the rat prostatic duct // *Endocrinology*, 1992. Vol.130. P.3066–3073.
74. Prins G.S., Korach K.S. The role of estrogens and estrogen receptors in normal prostate growth and disease // *Steroids*, 2008. Vol. 73. P. 233–244.

75. Qin Q., Xu Y., He T., Qin C., Xu J. Normal and disease-related biological functions of Twist1 and underlying molecular mechanisms // *Cell research*, 2012. Vol. 22, issue 1. P. 90-106.
76. Robinson D., Zylstra C., Williams B. Wnt signaling and prostate cancer // *Curr. Drug Targets*, 2008. Vol. 9(7). P. 571–780.
77. Ronnov-Jessen L, Petersen OW, Koteliensky VE, Bissell MJ: The origin of the myofibroblasts in breast cancer. Recapitulation of tumor environment in culture unravels diversity and implicates converted fibroblasts and recruited smooth muscle cells // *J Clin Invest*, 1995. Vo. 95. P. 859–73.
78. Sánchez-Tilló E., Liu Y., de Barrios O., Siles L., Fanlo L., Cuatrecasas M., Darling D., Dean D., Castells A., Postigo A. EMT-activating transcription factors in cancer: beyond EMT and tumor invasiveness // *Cell Mol Life Sci*, 2012. Vol.69. P. 3429–3456.
79. Sherwood E., Berg L., McEwan R., Pasciak R., Kozlowski J., Lee C. Two-dimensional protein profiles of cultured stromal and epithelial cells from hyperplastic human prostate // *Journal of Cellular Biochemistry*, 1989. Vol. 40, issue 2. P. 201-214.
80. Signoretti S., Waltregny D., Dilks J., Isaac B., Lin D., Garraway L., Yang A., Montironi R., McKeon F., Loda M. p63 Is a Prostate Basal Cell Marker and Is Required for Prostate Development // *The American Journal of Pathology*, 2000. Vol. 157, issue 6. P. 1769-1775.
81. Smith B., Odero-Marah V. The role of Snail in prostate cancer // *Cell Adhesion and Migration*, 2012. Vol. 6, issue 5. P. 433-441.
82. Stoyanova T., Cooper A., Drake J., Liu X., Armstrong A., Pienta K., Zhang H., Kohn D., Huang J., Witte O., Goldstein A. Prostate cancer originating in basal cells progresses to adenocarcinoma propagated by luminal-like cells // *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013. Vol. 110, issue 50. P. 20111-20116.
83. Taylor R., Toivanen R., Risbridger G.P. Stem cells in prostate cancer: treating the root of the problem // *Endocrine-Related Cancer*, 2010. Vol.17. P.273–285.
84. Thiery J. Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression // *Nature Reviews Cancer*, 2002. Vol. 2, issue 6. P. 442-454.

85. Tomita K., van Bokhoven A., van Leenders G., Ruijter E., Jansen C., Bussemakers M., Schalken J. Cadherin switching in human prostate cancer progression // *Cancer research*, 2000. Vol. 60, issue 13. P. 3650-3654.
86. Tomlins S.A., Rhodes D.R., Perner S., Dhanasekaran S.M., Mehra R., Sun X.W., Varambally S., Cao X., Tchinda J., Kuefer R., et al. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer // *Science*, 2005. Vol. 310. P. 644–648.
87. Tran N., Nagle R., Cress A., Heimark R. N-Cadherin expression in human prostate carcinoma cell lines // *The American Journal of Pathology*, 1999. Vol. 155, issue 3. P. 787-798.
88. Tu W.H., Thomas T.Z., Masumori N., Bhowmick N.A., Gorska A.E., et al. The loss of TGF-beta signaling promotes prostate cancer metastasis // *Neoplasia*, 2003. Vol. 5. P. 267–77.
89. Tuch B.E. Stem cells—A clinical update // *Aust. Fam. Physician*, 2006. Vol. 35. P. 719–721.
90. Tuxhorn J.A., Ayala G.E., Smith M.J., Smith V.C., Dang T.D., Rowley D.R. Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling // *Clin Cancer Res*, 2002. Vol. 8. P. 2912–2923.
91. Van der Heul-Nieuwenhuijsen L., Hendriksen P., van der Kwast T., Jenster G. Gene expression profiling of the human prostate zones // *BJU Int*, 2006. Vol. 98, issue 4. P. 886-897.
92. Vander Griend D.J., Karthaus W.L., Dalrymple S., Meeker A., DeMarzo A.M. & Isaacs J.T. The role of CD133 in normal human prostate stem cells and malignant cancerinitiating cells // *Cancer Research*, 2008. Vol. 68. P. 9703–9711.
93. Vandewalle C., Van Roy F., Berx G. The role of the ZEB family of transcription factors in development and disease // *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2009. Vol. 66, issue 5. P. 773-787.
94. Verhagen A., Ramaekers F., Aalders T., Schaafsma H., Debruyne F., Schalken J. Colocalization of Basal and Luminal Cell-type Cytokeratins in Human Prostate Cancer // *Cancer Research*, 1992. Vol. 52. P. 6182-6187.

95. Wang X., Kruithof-de Julio M., Economides K.D., Walker D., Yu H., Halili M.V., Hu Y.P.; Price S.M., Abate-Shen C., Shen M.M. A luminal epithelial stem cell that is a cell of origin for prostate cancer // *Nature*, 2009. Vol. 461. P. 495–500.
96. Wheelock M., Shintani Y., Maeda M., Fukumoto Y., Johnson K. Cadherin switching // *J. Cell Sci.*, 2008. Vol. 121(Pt 6). P. 727–735.
97. Whitaker H., Girling J., Warren A., Leung H., Mills I., Neal D. Alterations in β -catenin expression and localization in prostate cancer // *Prostate*, 2008. Vol. 68, issue 11. P. 1196-1205.
98. White C., Xie J., Ventura S. Age-related changes in the innervation of the prostate gland: implications for prostate cancer initiation and progression // *Organogenesis*, 2013. Vol. 9, issue 3. P. 206-15.
99. Wu J., Haugk K., Woodke L., Nelson P., Coleman I., et al. Interaction of IGF signaling and the androgen receptor in prostate cancer progression // *J Cell Biochem*, 2006. Vol. 99. P. 392–401.
100. Yardy G., Brewster S. Wnt signalling and prostate cancer // *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 2005. Vol. 8, issue 2. P. 119-126.